

**Untersuchungen zur Interaktion von Prp4p-Kinase  
und dem Spleißfaktor Prp1p**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von

Wiebke Schwelnus

aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Norbert F. Käufer

2. Referent: Prof. Dr. Ralf Schnabel

eingereicht am: 05.02.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.03.2004

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Herrn Prof. Dr. N. F. Käufer, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Schwelnus, W., Richert, K., Opitz, F., Groß, T., Habara, Y., Tani, T., Käufer, N. F. (2001)  
Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. EMBO reports 2 (1): 35 – 41

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1999 bis Februar 2004 am Institut für Genetik der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Bei Herrn Professor Dr. Norbert. F. Käufer möchte ich mich ganz besonders für seinen großen Einsatz bei der Betreuung der praktischen sowie der kritische Durchsicht der schriftlichen Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Ralf Schnabel danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und für die Übernahme des Koreferates.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Jürgen Wehland, Herrn Dr. Josef Wissing und Herrn Dr. Werner Tegge von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Messungen am Massenspektrometer bzw. für die Vorbereitung und Hilfe bei der Durchführung der Versuche mit der Prp1-Peptidbibliothek. Herrn Dr. Henning Urlaub vom Max-Planck-Institut in Göttingen danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen zur Identifizierung des phosphorylierten Prp1-Fragments.

Für die Hilfe und Mitarbeit bei einigen Experimenten möchte ich mich bei Frau Susanne Zock-Emmenthal, Frau Claudia Bottner, Frau Dr. Kathrin Richert und ganz besonders bei Frau Urda Rüdric bedanken. Allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik, besonders der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Käufer, danke ich für das gute Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann und bei meinen Eltern ganz herzlich für ihre fortwährende Unterstützung bedanken.

Braunschweig im Februar 2004

Wiebke Schwelnus

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1. Ziel dieser Arbeit	7
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>8</b>
3.1. Die temperatursensitiven Mutationen von Prp1p und Prp4p führen zu einer Zellzyklus-arretierung in der G1- und in der G2-Phase	8
3.2. Die Prp4-Kinase phosphoryliert Prp1p <i>in vitro</i>	10
3.3. Die Prp4-Kinase phosphoryliert Srp1p und Srp2p <i>in vitro</i>	14
3.4. Prp4p phosphoryliert Prp1p auch <i>in vivo</i>	15
3.5. Identifizierung der Phosphorylierungsstellen in Prp1p	16
3.5.1. Prp4p ist eine „dual specificity“ Kinase und phosphoryliert Prp1p an Threonin-Resten	16
3.5.2. Abschätzung der Anzahl der Phosphorylierungsstellen in Prp1p	17
3.5.3. Suche nach den Prp1-Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie	20
3.5.4. Suche nach den Prp1-Phosphorylierungsstellen mittels einer Prp1-Peptidbibliothek	23
3.5.5. Die Phosphorylierungsstellen von Prp1p liegen innerhalb eines 19,1 kDa großen Abschnitts des Proteins	29
<b>4. Diskussion</b>	<b>33</b>
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>38</b>
5.1. Geräte	38
5.2. Chemikalien	38
5.3. Medien	40
5.4. Stämme	40
5.4.1. <i>S. pombe</i> -Stämme	40
5.4.2. <i>E. coli</i> -Stämme	41
5.5. Vektoren	41
5.5.1. pRHA42/pRIPHA42	41
5.5.2. pUC18	42
5.5.3. Der QIAexpressionist™	43
5.5.4. Das Glutathion-S-Transferase Expressionssystem	44
5.6. Standard DNA-Methoden	45
5.6.1. Transformation von <i>E. coli</i>	45
5.6.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	46
5.6.3. PCIA-Extraktion und Fällung von Plasmid-DNA	46

5.6.4.	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen	47
5.6.5.	Dephosphorylierung von DNA	47
5.6.6.	DNA-Ligation	47
5.6.7.	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	47
5.6.8.	DNA-Sequenzierung	48
5.7.	Gerichtete Mutagenese von <i>prp1</i>	48
5.8.	Standard Protein-Methoden	49
5.8.1.	Proteinbestimmung nach Bradford	49
5.8.2.	Umpuffern und Konzentrieren von Proteinlösungen mittels Ultrafiltration	50
5.8.3.	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
5.8.4.	Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)	50
5.8.5.	Immunodetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	50
5.8.6.	Isolierung von Proteinextrakten aus <i>S. pombe</i>	51
5.8.7.	Immunpräzipitation	51
5.8.8.	Acetonfällung	51
5.9.	Aufreinigung in <i>E. coli</i> exprimierter Proteine	52
5.9.1.	Expression und Aufreinigung von Prp4p	52
5.9.2.	Expression und Aufreinigung von His <sub>6</sub> -Prp1p	52
5.9.3.	Expression und Aufreinigung von His <sub>6</sub> -Srp1p und His <sub>6</sub> -Srp2p	53
5.10.	Kinaseassays	54
5.11.	FACS-Analyse	54
5.12.	<i>in vivo</i> -Markierung von Prp1p	55
5.13.	Methoden zur Untersuchung phosphorylierter Proteine	55
5.13.1.	Phosphoaminosäureanalyse	55
5.13.2.	Phosphopeptidmap	56
5.13.3.	Massenspektrometrie	57
5.13.4.	Peptidbibliothek	58
5.13.5.	Spaltung von Proteinen mit Ameisensäure	59
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>69</b>
7.1.	Aminosäuresequenz von Prp1p	69
7.2.	Sequenzen und Massen tryptischer Prp1-Peptide	70

## ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxydisulfat
ars	autonome Replikationssequenz
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cdc	cell division cycle
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
h	Stunde(n)
HA	Hemagglutinin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobase(n)
mcs	multiple cloning site
min	Minute(n)
MWCO	molecular weight cut-off
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate-buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
prp	pre-mRNA processing
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TBS	TRIS-buffered saline
TPR	tetratrico peptide repeat
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## 1 Zusammenfassung

Die Prp4p-Kinase wurde bei Versuchen mit prä-mRNA-Spleißmutanten der Spaltheife *S. pombe* identifiziert. Sie zeigt genetische Interaktionen mit den Spleißfaktoren Spp41p, Spp42p, Cdc5p, Prp5p, Prp10p, Rnps1 und Prp1p. Bei Prp1p handelt es sich um ein Protein mit 19 TPR-Motiven, das als Bindeglied zwischen U5- und U4/U6-snRNP diskutiert wird. In dieser Arbeit wurde die Beziehung zwischen Prp1p und Prp4p näher untersucht.

Die weitere Charakterisierung des temperatursensitiven *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes sowie eines Stammes mit dem mit *prp4-73<sup>ts</sup>* synthetisch letalem *prp1-4<sup>ts</sup>*-Allel ergab, daß beide Stämme bei der restriktiven Temperatur in der G1- und in der G2-Phase des Zellzyklus arretieren. Die Aktivität von Prp4p und Prp1p scheint für den Übergang von der G1- in die S-Phase sowie von der G2-Phase in die Mitose erforderlich zu sein.

Bakteriell produziertes Prp1p wird *in vitro* von Prp4p phosphoryliert. Die *in vivo*-Markierung eines Stammes mit dem *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel zeigte, daß Prp1p bei der restriktiven Temperatur nicht länger als Phosphoprotein vorliegt. Bei Prp1p handelt es sich also offensichtlich um ein physiologisches Substrat von Prp4p. Desweiteren konnten mit den SR-Proteinen Srp1p und Srp2p zwei weitere *in vitro*-Substrate von Prp4p identifiziert werden.

*In vitro* findet die Phosphorylierung von Prp1p hauptsächlich an Threoninen statt. Es gibt mindestens drei Phosphorylierungsstellen der Prp4p-Kinase in Prp1p. Es wurde versucht, diese mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren. Dabei konnten jedoch nur 24 % bzw. 34 % der Prp1-Peptide detektiert werden. Die Peptide waren z. T. bereits von Kinasen aus *E. coli* phosphoryliert worden, so daß sie auch in den Kontrollspektren in der phosphorylierten Form nachgewiesen werden konnten.

In einem anderen Ansatz sollte der Nachweis der Phosphorylierungsstellen über die Inkubation von Prp1-Peptiden mit bakteriell exprimierter Prp4p-Kinase erfolgen. Die dabei detektierten Phosphorylierungssignale erwiesen sich als unspezifisch.

Die Spaltung von *in vitro* phosphoryliertem Prp1p mit Ameisensäure zeigte, daß die Phosphorylierungsstellen innerhalb eines 19,1 kDa großen Fragments am N-Terminus des Proteins liegen. Der die TPR-Motive umfassende C-terminale Bereich von Prp1p wird nicht phosphoryliert.



## 2 Einleitung

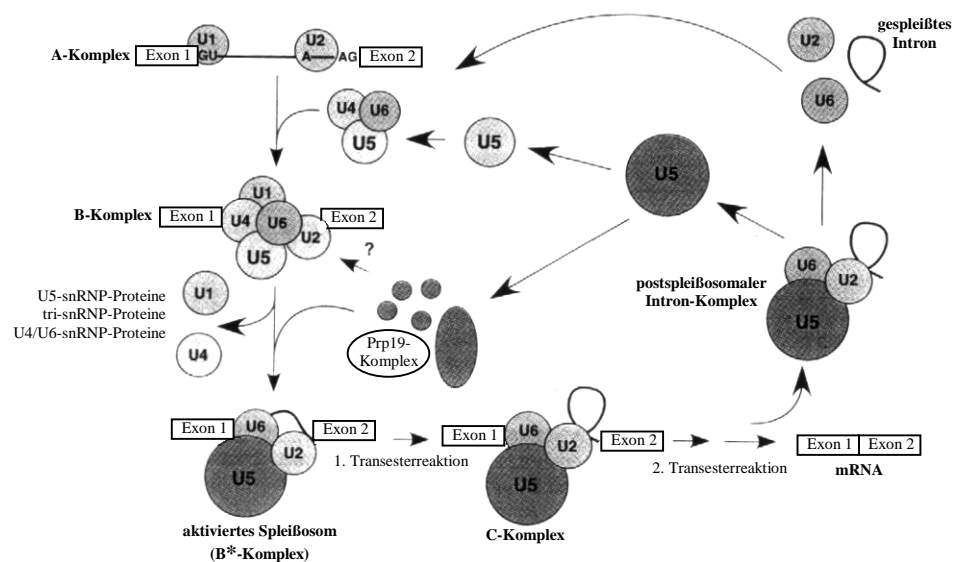
In den meisten eukaryontischen Genen werden die kodierenden Bereiche (Exons) von nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) unterbrochen. Um eine korrekte Genexpression zu gewährleisten, müssen die Introns in einem als „prä-mRNA-Spleißen“ bezeichneten Vorgang aus der prä-mRNA entfernt und die einzelnen Exons miteinander verknüpft werden.

Das Spleißen eines Introns läuft über zwei aufeinanderfolgende Transesterreaktionen im Spleißosom ab. Dabei handelt es sich um einen aus den fünf snRNAs (small nuclear RNAs) U1, U2, U5 und U4/U6 sowie zahlreichen Proteinen bestehenden Ribonucleoprotein-Komplex [Sharp, 1994; Kuhn und Käufer, 2002; Kuhn und Käufer, 2003]. Dieser Komplex ist nicht statisch. Vielmehr durchlaufen sowohl die Protein- als auch die RNA-Komponenten während eines Spleißzyklus zahlreiche Veränderungen in ihrer Zusammensetzung und in ihren Interaktionen.

Der Spleißzyklus wurde mit Hilfe von *in vitro*-Spleißsystemen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und Mammalia-Zellen untersucht. Er beginnt mit dem Zusammenbau des Spleißosoms auf dem Intron: zunächst binden die snRNPs U1 und U2 an die prä-mRNA, wodurch der sogenannte A-Komplex entsteht. Durch nachfolgende Anlagerung des U4/U6.U5 tri-snRNPs wird der B-Komplex gebildet. Die Aktivierung des Spleißosoms ist von zahlreichen Konformationsänderungen begleitet: Die Basenpaarungen zwischen der U4- und der U6-snRNA werden gelöst und die U1- und U4-snRNPs dissoziieren ab. Neue Basenpaarungen bilden sich zwischen den U2- und U6-snRNAs sowie der U6-snRNA und dem Branchpoint aus. Anschließend erfolgt die Katalyse der ersten Transesterreaktion und es entsteht der C-Komplex. Dieser katalysiert die zweite Transesterreaktion, nach der die mRNA freigesetzt wird. Der aus den U2-, U5- und U6-snRNPs sowie dem ausgeschnitten Intron bestehende post-spleißosomale Komplex zerfällt und die snRNPs werden für eine neue Runde des Spleißzyklus verwendet [Sharp, 1994; Staley und Guthrie, 1998; Burge *et al.*, 1999; Brow, 2002;].

Während die beiden Spleißreaktionen vermutlich RNA-katalysiert sind [Valadkhan und Manley, 2001; Newman, 2001; Sontheimer, 2001], werden die zahlreichen strukturellen Rearrangements, die das Spleißosom während eines Spleißzyklus durchläuft, vermutlich von Proteinen ausgeführt. Von besonderem Interesse sind dabei die Änderungen in der snRNP-Struktur und -Zusammensetzung, die mit der Aktivierung des Spleißosoms verbunden sind. Kürzlich konnte ein Spleißkomplex isoliert werden, der sich auf einer radioaktiv markierten RNA nach deren Zugabe zu HeLa-Zellextrakten gebildet hatte. Er enthielt gleiche Mengen U2-, U5 und U6-snRNA sowie prä-mRNA. Weder die U1- und U4-snRNAs noch Spleiß-

intermediate waren in diesem Komplex nachweisbar. Das spricht dafür, daß es sich dabei um eine Form des Spleißosoms handelt, die zwischen den Komplexen B und C gebildet wird. Sie wurde deshalb als B\*-Komplex bzw. aktiviertes Spleißosom bezeichnet. Um die mit der Aktivierung des Spleißosoms einhergehenden Änderungen auf der Proteinebene zu untersuchen, wurde die Proteinzusammensetzung des B\*-Komplexes bestimmt und mit der des B-Komplexes verglichen. Dabei zeigte sich, daß zusammen mit den U1- und U4-snRNAs alle U1-spezifischen und die meisten U4/U6-spezifischen Proteine verschwinden. Auch zwei U5-sowie drei tri-snRNP-spezifische Proteine sowie die meisten Lsm-Proteine ließen sich im aktivierten Spleißosom nicht mehr nachweisen. Dafür werden bei diesem Übergang einige neue Proteine an das Spleißosom angelagert, wobei vor allem die Zusammensetzung des U5-snRNPs erheblich verändert wird [Makarov *et al.*, 2002]. Der um den B\*-Komplex erweiterte Spleißzyklus ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1:**

Schematische Darstellung des Spleißzyklus (nach [Makarov *et al.*, 2002]).

Unter den Proteinen, die beim Übergang vom B- zum B\*-Komplex neu an das Spleißosom angelagert werden, sind die Komponenten des Prp19-Komplexes [Makarov *et al.*, 2002]. Dieser snRNA-freie Komplex ist für das prä-mRNA-Spleißen essentiell. Er besteht in *S. cerevisiae* aus mindestens acht Proteinen [Chen *et al.*, 2002]. Es konnte gezeigt werden, daß der Prp19-Komplex nach der Dissoziation des U4-snRNPs an das Spleißosom angelagert wird und dann für eine stabile Bindung der U5- und U6-snRNPs sorgt. Mit dieser Anlagerung ist eine Änderung der Basenpaarungen zwischen der U6-snRNA und der 5'-Spleißstelle der prä-mRNA sowie eine Änderung in der Struktur des U6-snRNPs verbunden. In deren Folge kommt es vermutlich zur Ablösung der sieben Lsm-Proteine, die ringförmig an das 3'-

terminale Ende der U6-snRNA gebunden sind. Es ist unklar, ob diese im Rahmen der Aktivierung des Spleißosoms stattfindenden Änderungen in der snRNP-Struktur durch den Prp19-Komplex als ganzes ausgelöst werden, oder ob verschiedene Komponenten dieses Komplexes unterschiedliche Rearrangements katalysieren [Chan *et al.*, 2003].

Bislang ist wenig über den Aufbau und die Aktivierung des Spleißosoms *in vivo* bekannt. Einige Beobachtungen sprechen für ein alternatives Modell des Spleißosomzusammenbaus: in Mammalia nimmt der U4/U6.U5 tri-snRNP eher Kontakt mit der prä-mRNA auf, als nach dem Modell in Abb. 1.1 zu erwarten wäre [Maroney *et al.*, 2000] und aus zellfreien Extrakten von *S. cerevisiae* konnte ein spleißosomaler Komplex isoliert werden, der alle fünf U-RNAs sowie 85 % aller identifizierten Spleißfaktoren enthielt [Stevens *et al.*, 2002]. Diese Ergebnisse lassen sich eher mit einem Modell in Einklang bringen, in dem ein bereits zusammengebautes Spleißosom an die Introns bindet und dann die mit der Aktivierung verbundenen Rearrangements ausgelöst werden.

Unabhängig davon, welches der beiden Modelle die Verhältnisse *in vivo* besser beschreibt, stellt sich die Frage nach der Regulation der Rearrangements während des Zusammenbaus des Spleißosoms und dessen Aktivierung. Ein weit verbreiteter Mechanismus zur Regulation zellulärer Vorgänge ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen bzw. -phosphatasen. Es wird geschätzt, daß etwa 30 % der Proteine einer Zelle phosphoryliert werden. Darunter sind auch Proteine, die am prä-mRNA Spleißen beteiligt sind. Zudem wurden mehrere Kinasen und Phosphatasen mit dem prä-mRNA-Spleißen in Verbindung gebracht. Für das Verständnis der Spleißregulation ist es wichtig, zu untersuchen, welche Kinasen und Phosphatasen zu bestimmten Zeitpunkten des Spleißzyklus aktiv sind und welches ihre jeweiligen Substrate sind. Bislang ist darüber wenig bekannt [Misteli, 1999; Murray, 1999].

Die erste Kinase, für die ein Zusammenhang mit dem Spleißen nachgewiesen werden konnte, ist die Prp4-Kinase aus *Schizosaccharomyces pombe*. Das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel wurde bei einem Screen von temperatursensitiver Mutanten identifiziert, die einen Spleißdefekt haben [Rosenberg *et al.*, 1991]. Bislang sind in der Literatur 14 *prp*-Mutanten (pre-mRNA-processing) von *S. pombe* bekannt. Sie alle stellen nach dem Shift auf die restriktive Temperatur das Wachstum ein und akkumulieren prä-mRNA [Urushiyama *et al.*, 1996; Potashkin *et al.*, 1998].

Durch Komplementierung der *prp4-73<sup>ts</sup>*-Mutante mit einer Genbank wurde das *prp4*-Wildtypgen isoliert. Das Gen ist essentiell für das Wachstum der Hefe und kodiert für ein aus 477 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem theoretischem Molekulargewicht von 55

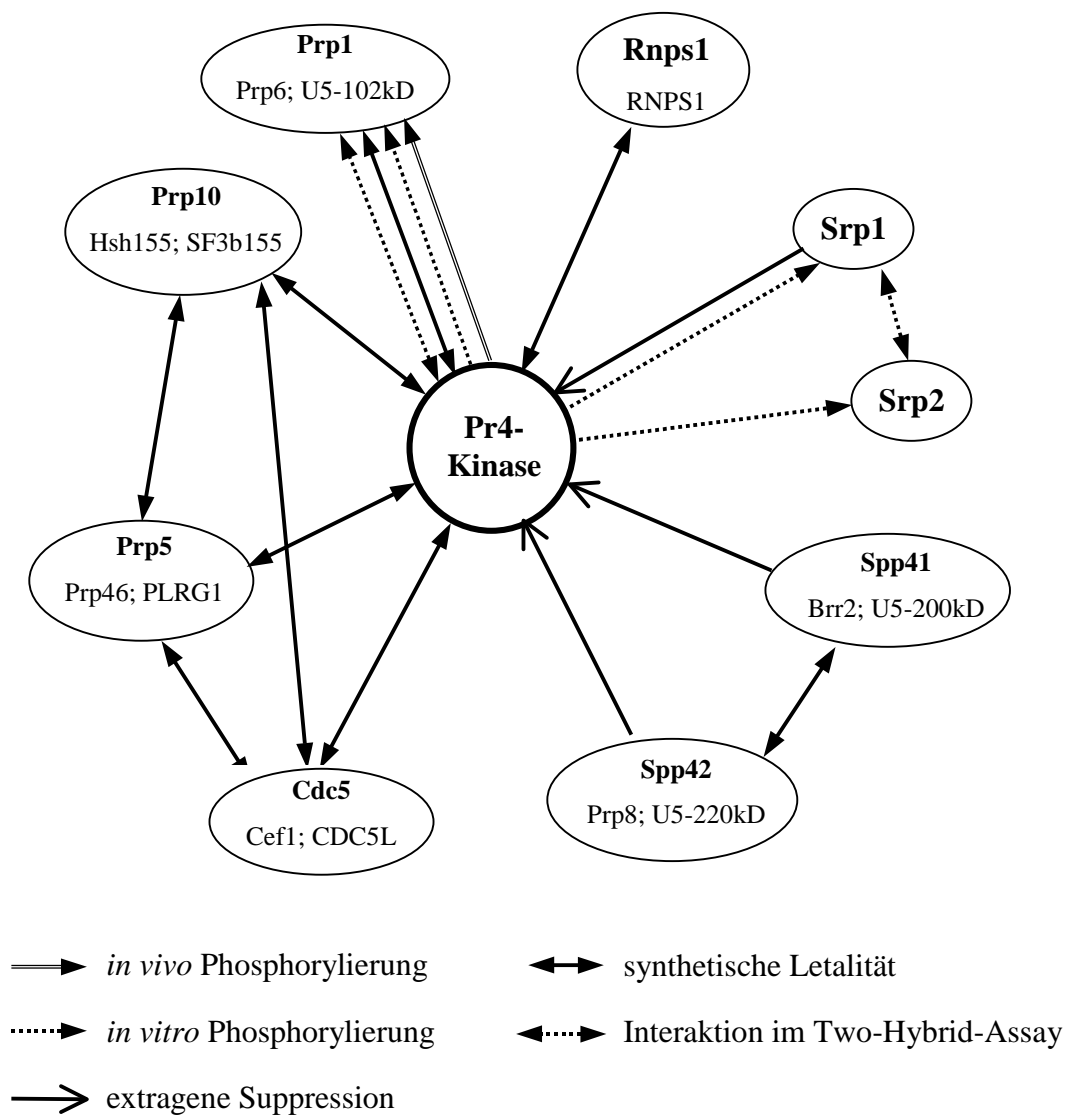
kDa [Alahary *et al.*, 1993]. Mittlerweile wurden auch in der Maus und dem Menschen Prp4-Homologe identifiziert [Kojima *et al.*, 2001; Dellaire *et al.*, 2002]. In *S. cerevisiae* hingegen kommt keine Kinase mit signifikanter Ähnlichkeit zu Prp4p vor [Käufer und Potashkin, 2000].

Um Hinweise auf die Funktion der Prp4-Kinase beim prä-mRNA Spleißen zu erhalten, wurde nach extragenen Suppressoren des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allels gesucht. Dabei wurden *spp41* und *spp42* identifiziert. *spp41* kodiert wahrscheinlich das *S. pombe*-Homolog der DExD/H-Box RNA-Helikase Brr2 [Käufer, persönliche Mitteilung]. Es wird vermutet, daß Brr2 die für die Aktivierung des Spleißosoms erforderliche Entwindung der U4- und U6-snRNAs katalysiert [Staley und Guthrie, 1998]. Spp42 ist das *S. pombe* Homolog von Prp8p aus *S. cerevisiae* [Schmidt *et al.*, 1999]. Prp8p ist ein Protein des U5 snRNPs, das im katalytischen Zentrum des Spleißosoms möglicherweise als Kofaktor dient, indem es bestimmte RNA-Strukturen ermöglicht und stabilisiert [Collins und Guthrie, 1999; Kuhn und Brow, 2000; Kuhn *et al.*, 2002].

In einem anderen Ansatz zur Aufklärung der Prp4-Funktion wurde nach Allelen gesucht, die synthetisch letal mit *prp4-73<sup>ts</sup>* sind. Zwei Allele sind synthetisch letal, wenn Zellen, die beide Allele im genetischen Hintergrund tragen, nicht mehr wachsen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die von den Allelen kodierten Proteine miteinander interagieren oder zumindest am selben Prozeß beteiligt sind [Forsburg, 2001]. Für die Untersuchungen wurde der *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm mit Stämmen gekreuzt, die verschiedene temperatursensitive *prp*- bzw. *cdc*-Allele (cell division cycle) trugen. Dabei zeigte sich, daß Mutationen in den Genen für Prp1p, Prp5p, Prp10p, Cdc5p und Rnps1p synthetisch letal mit *prp4-73<sup>ts</sup>* sind [Urushiyama *et al.*, 1997; Richert, 2002]. Mit Ausnahme von Rnps1, das kein *S. cerevisiae*-Homolog besitzt, gibt es für alle diese Proteine Homologe im Mensch und in *S. cerevisiae* [Käufer und Potashkin, 2000].

Prp1p ist ein essentielles Gen, das eine Funktion beim prä-mRNA-Spleißen und möglicherweise auch eine beim mRNA-Transport aus dem Kern hat. Das 102 kDa große Protein besitzt an seinem C-Terminus 19 aufeinanderfolgende TPR-Motive, die wahrscheinlich zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen dienen [Urushiyama *et al.*, 1997; Lamb *et al.*, 1995]. Es wird vermutet, daß Prp1p im tri-snRNP die U5- und U4/U6-snRNPs miteinander verbindet [Makarov *et al.*, 2000]. Prp5p und Cdc5p lassen sich zusammen mit weiteren Proteinen in einem 40S Komplex aufreinigen, der die U2, U5 und U6 snRNAs enthält. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um einen postkatalytischen Komplex unmittelbar vor dem Recycling der einzelnen snRNPs [Mc Donald *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2002]. Das Homolog von Prp10p im Menschen, SF3b155, ist Bestandteil eines mit dem U2 snRNP

assoziierten Proteinkomplexes und bindet die prä-mRNA zu beiden Seiten des Branchpoints. Vermutlich unterstützt es damit die Anlagerung des U2-snRNPs [Gozani *et al.*, 1998]. RNPS1 wurde zunächst im Menschen als genereller Spleißfaktor identifiziert. Später konnte gezeigt werden, daß er nach der Beendigung der Spleißreaktion zusammen mit einigen weiteren Proteinen an der Exon/Exon-Grenze gebunden bleibt. Dies scheint für den Transport der mRNA ins Cytoplasma erforderlich zu sein [Mayeda *et al.*, 1999; Le Hir *et al.*, 2000]. Abb. 2.2 zeigt eine Zusammenfassung der bisher gefundenen genetischen und biochemischen Interaktionen von Prp4p mit verschiedenen Spleißfaktoren. Deren Interaktionen untereinander wurden, soweit bekannt, ebenfalls eingezeichnet.



**Abb. 2.2:**

Schematische Darstellung der intermolekularen Interaktionen der Prp4-Kinase aus *S. pombe*. Sofern in *S. cerevisiae* und in *H. sapiens* homologe Proteine identifiziert werden konnten, wurden deren Namen ebenfalls angegeben [Kuhn und Käufer, 2003].

### 1.1 Ziel der Arbeit

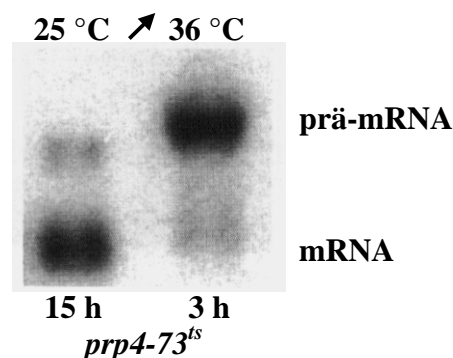
Um Hinweise auf die Funktion der Prp4p-Kinase aus *S. pombe* beim prä-mRNA-Spleißen zu erhalten, wurden mehrere Spleißfaktoren identifiziert, die genetisch mit Prp4p interagieren. Einer dieser Spleißfaktoren ist Prp1p. In dieser Arbeit sollte die Beziehung zwischen Prp1p und Prp4p näher untersucht werden.

Dazu sollten die beiden Proteine mit Hilfe bakterieller Expressionssysteme produziert und aufgereinigt werden. Anschließend sollte in *in vitro*-Kinaseassays getestet werden, ob die Prp4p-Kinase Prp1p phosphoryliert. Desweiteren sollte überprüft werden, ob Prp1p ein *in vivo*-Substrat von Prp4p ist. Um die Auswirkung der Phosphorylierung von Prp1p durch die Prp4p-Kinase auf das prä-mRNA-Spleißen untersuchen zu können, sollten anschließend die *in-vitro*-Phosphorylierungsstellen von Prp1p identifiziert werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die temperatursensitiven Mutationen von Prp1p und Prp4p führen zu einer Zellzyklusarretierung in der G1- und in der G2-Phase

Prp4p aus der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* ist die erste Kinase, für die ein Zusammenhang mit dem prä-mRNA-Spleißen nachgewiesen werden konnte. Bei einem Screen temperatursensitiver Mutanten nach Defekten beim prä-mRNA-Spleißen wurde das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel dieser Kinase identifiziert. Es trägt eine Punktmutation in der Kinasedomäne, die an Position 235 des Proteins zum Einbau eines Tyrosins statt eines Cysteins führt. *S. pombe*-Stämme mit dem *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel stellen nach dem Shift auf die restriktive Temperatur ihr Wachstum ein [Rosenberg *et al.*, 1991; Alahari *et al.*, 1993]. Wie in Abbildung 3.1 am Beispiel des *tfIId*-Gens gezeigt ist, geht die Einstellung des Wachstums einher mit der Akkumulation von prä-mRNA. Drei Stunden nach dem Temperaturshift ist kaum noch mRNA nachweisbar.

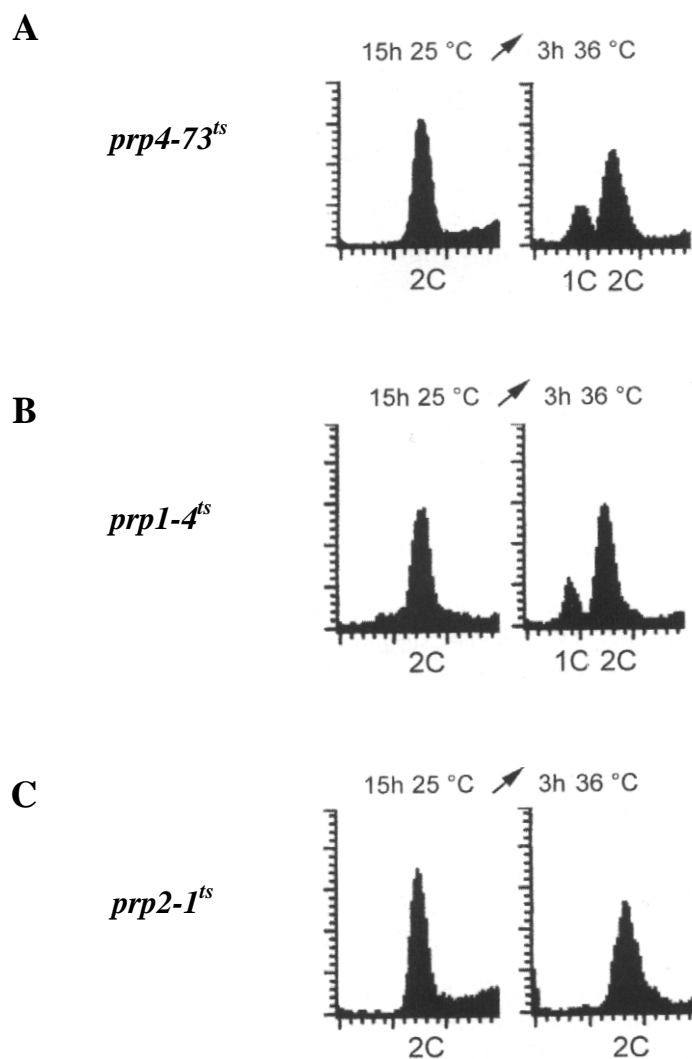


**Abb. 3.1:**

Northern-Analyse eines *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes nach 15 h Inkubation bei der permissiven Temperatur von 25 °C sowie 3 h nach dem Shift auf die restriktive Temperatur von 36 °C. Als radioaktiv markierte Sonde wurde das *tfIId*-Gen verwendet, das das TATA-Bindeprotein kodiert.

Bei der Suche nach Interaktionspartnern dieser Kinase konnte gezeigt werden, daß u. a. das temperatursensitive Allel *prp1-4* des Spleißfaktors Prp1p synthetisch letal mit *prp4-73<sup>ts</sup>* ist. Um die *prp4-73<sup>ts</sup>*- und *prp1-4<sup>ts</sup>*-Mutanten näher zu charakterisieren, wurden FACS-Analysen von Stämmen mit diesen Allelen durchgeführt. Mit Hilfe der FACS-Analyse ist es möglich, den DNA-Gehalt der Zellen einer Kultur quantitativ zu erfassen. Dieser gibt Auskunft darüber, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen gerade befinden. Wie bei allen Eukaryonten ist der Zellzyklus von *S. pombe* in die G1-, S-, G2- und M-Phase unterteilt. Die

G2-Phase ist bei dieser Hefe verlängert und nimmt bis zu 75 % des Zellzyklus ein [Mitchinson, 1970]. Während der Mitose wird die Kernmembran nicht aufgelöst und die Teilung des Zellkerns geht der Zellteilung voraus. Die Zellen treten also mit einem DNA-Gehalt von 2C in die G1-Phase ein, in deren Verlauf das Septum gebildet wird und die Tochterzellen voneinander getrennt werden. Deshalb haben über 90 % der Zellen einer wachsenden *S. pombe*-Kultur einen DNA-Gehalt von 2C, so daß dessen Messung in der FACS-Analyse nur zu einem Peak führt (Abb. 3.2A, B und C, 25 °C).



**Abb. 3.2:**

FACS-Analyse von mit Propidiumiodid angefärbten Zellen. (A) *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm nach 15 h bei 25 °C und 3 h bei 36 °C. (B) *prp1-4<sup>ts</sup>*-Stamm nach 15 h bei 25 °C und 3 h bei 36 °C. (C) *prp2-1<sup>ts</sup>*-Stamm nach 15 h bei 25 °C und 3 h bei 36 °C. Die Peaks bei 1C und 2C repräsentieren Zellen mit charakteristischem DNA-Gehalt für die G1- und G2-Phase des Zellzyklus.



Bei der FACS-Analyse der Stämme mit den *prp4-73<sup>ts</sup>*- bzw. *prp1-4<sup>ts</sup>*-Allelen drei Stunden nach dem Shift auf 36 °C zeigte sich, daß auch hier ein Großteil der Zellen einen DNA-Gehalt von 2C hat, jedoch ein signifikanter Teil der Zellpopulation auch einen 1C DNA-Gehalt aufweist (Abb. 3.2A und B). Damit unterscheiden sie sich von den anderen Stämmen mit einer der bislang 14 bekannten *prp*-Mutationen. Diese weisen drei Stunden nach dem Shift auf die restriktive Temperatur alle einen DNA-Gehalt von 2C auf. Als Beispiel wird hier die FACS-Analyse eines Stammes mit der *prp2-1<sup>ts</sup>*-Mutation gezeigt (Abb. 3.2C). Diese Beobachtung spricht dafür, daß sowohl die Aktivität von Prp4p als auch von die Prp1p für den Übergang von der G1- in die S-Phase sowie von der G2-Phase in die Mitose erforderlich ist [Schwelnus *et al.*, 2001].

### 3.2 Die Prp4p-Kinase phosphoryliert Prp1p *in vitro*

Neben der genetischen Interaktion weisen auch die Ergebnisse der FACS-Analyse auf eine direkte Interaktion zwischen Prp1p und Prp4p hin. Daher sollte untersucht werden, ob Prp1p ein Substrat der Prp4-Kinase ist. Aus *S. pombe*-Zellextrakten immunpräzipitierte Prp4p-Kinase phosphoryliert bakteriell exprimiertes Prp1p [Schmidt, 1999]. Um nachzuweisen, daß die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p spezifisch ist und nicht durch eine kopräzipitierende Kinase verursacht wird, wurden Kinaseassays durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde das Immunpräzipitat Prp4-K189I eingesetzt. Bei dieser mutierten Form der Prp4-Kinase war das Lysin an Position 189 durch Isoleucin ersetzt worden. Dieses in der Kinase-subdomäne II liegende Lysin ist in der gesamten Superfamilie der Proteinkinasen konserviert. Es ist für die korrekte Orientierung des ATPs für die Katalyse der Phosphorylierungsreaktion erforderlich, so daß ein Austausch dieser Aminosäure zum Verlust der Kinaseaktivität führt [Bossemeyer, 1995; Hanks und Hunter, 1995].

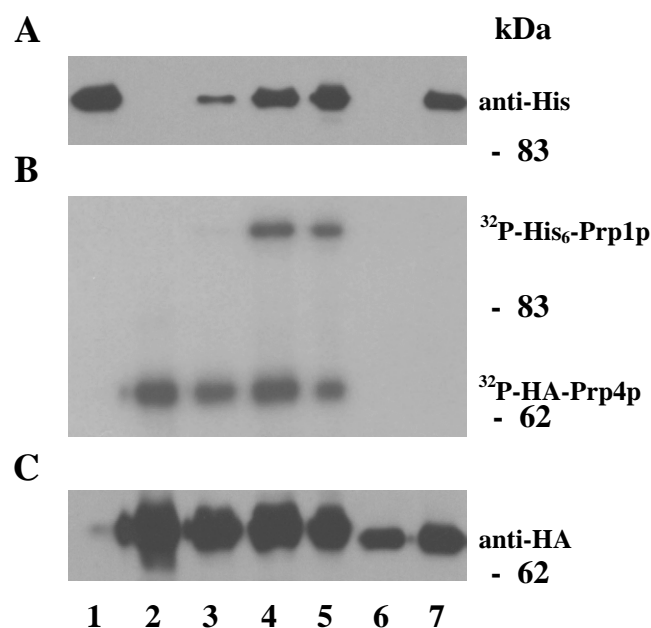
Die für die Kinaseassays eingesetzte Prp4p-Kinase wurde mit Hilfe eines Expressionsvektors in *S. pombe* als Fusionsprotein mit einem Hemagglutinin-Epitop (HA-Epitop) produziert. Von den Zellen wurden Extrakte angefertigt, aus denen HA-Prp4p mittels eines Antikörpers gegen das HA-Epitop immunpräzipitiert wurde.

Prp1p wurde mit Hilfe des Expressionssystems „The QIAexpressionist“ der Firma QIAGEN exprimiert und aufgereinigt. Dazu war *prp1<sup>+</sup>* in den Vektor pQE31 kloniert worden. Das von diesem Plasmid exprimierte Prp1p ist an seinem N-Terminus mit sechs Histidinresten fusioniert und wird im folgenden als His<sub>6</sub>-Prp1p bezeichnet. Das Protein läßt sich bei 37 °C in *E. coli* exprimieren [Schmidt, 1999]. Es zeigte sich jedoch, daß die Ausbeute an His<sub>6</sub>-Prp1p

mit 1 mg/l Bakterienkultur etwa fünf mal höher ist, wenn die Kultur nach Induktion der Proteinexpression über Nacht bei 17 °C inkubiert wird. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine mit NiNTA-Agarose gefüllte Säule.

Die anschließenden Schritte wie das Umpuffern und Konzentrieren des eluierten His<sub>6</sub>-Prp1p wurden durch die TPR-Motive des Proteins erschwert: beim Versuch, beide Schritte mit Hilfe der Ultrafiltration durchzuführen, war eine Rückgewinnung des Proteins nicht möglich. Wahrscheinlich aggregierten die einzelnen His<sub>6</sub>-Prp1p-Moleküle über ihre TPR-Motive miteinander und die Wechselwirkung dieser Aggregate mit der Membran der Ultrafiltrations-einheit waren zu stark für eine Rückgewinnung [Schmidt, 1999]. Stattdessen wurde das Eluat mit Hilfe der Dialyse in Kinasepuffer umgepuffert und mittels PEG konzentriert. Es war jedoch nicht möglich, His<sub>6</sub>-Prp1p-Konzentrationen über 0,2 mg/ml zu erhalten, ohne daß das Protein aus der Lösung ausfiel.

His<sub>6</sub>-Prp1p wurde in *in vitro*-Kinaseassays mit HA-Prp4p bzw. HA-Prp4p-K189I in Anwesenheit von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Abb. 3.3B zeigt das Autoradiogramm der Kinaseassays.



**Abb. 3.3:**

Phosphorylierung von bakteriell exprimiertem His<sub>6</sub>-Prp1p mit immunpräzipitierter HA-Prp4-Kinase. Die Komponenten der einzelnen Ansätze wurden 30' mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet.

Spur 1: 0,3 µg His<sub>6</sub>-Prp1p; Spur 2: 1 µl HA-Prp4p-Immunpräzipitat; Spur 3: 1 µl HA-Prp4p-Immunpräzipitat + 0,05 µg His<sub>6</sub>-Prp1p; Spur 4: 1 µl HA-Prp4p-Immunpräzipitat + 0,3 µg His<sub>6</sub>-Prp1p; Spur 5: 1 µl HA-Prp4p-Immunpräzipitat + 0,6 µg His<sub>6</sub>-Prp1p; Spur 6: 2 µl HA-Prp4p-K189I; Spur 7: 2 µl HA-Prp4p-K189I + 0,3 µg His<sub>6</sub>-Prp1p (A) Westernblot, inkubiert mit anti-His-Antikörper. (B) Autoradiogramm. (C) Westernblot, inkubiert mit anti-HA-Antikörper.

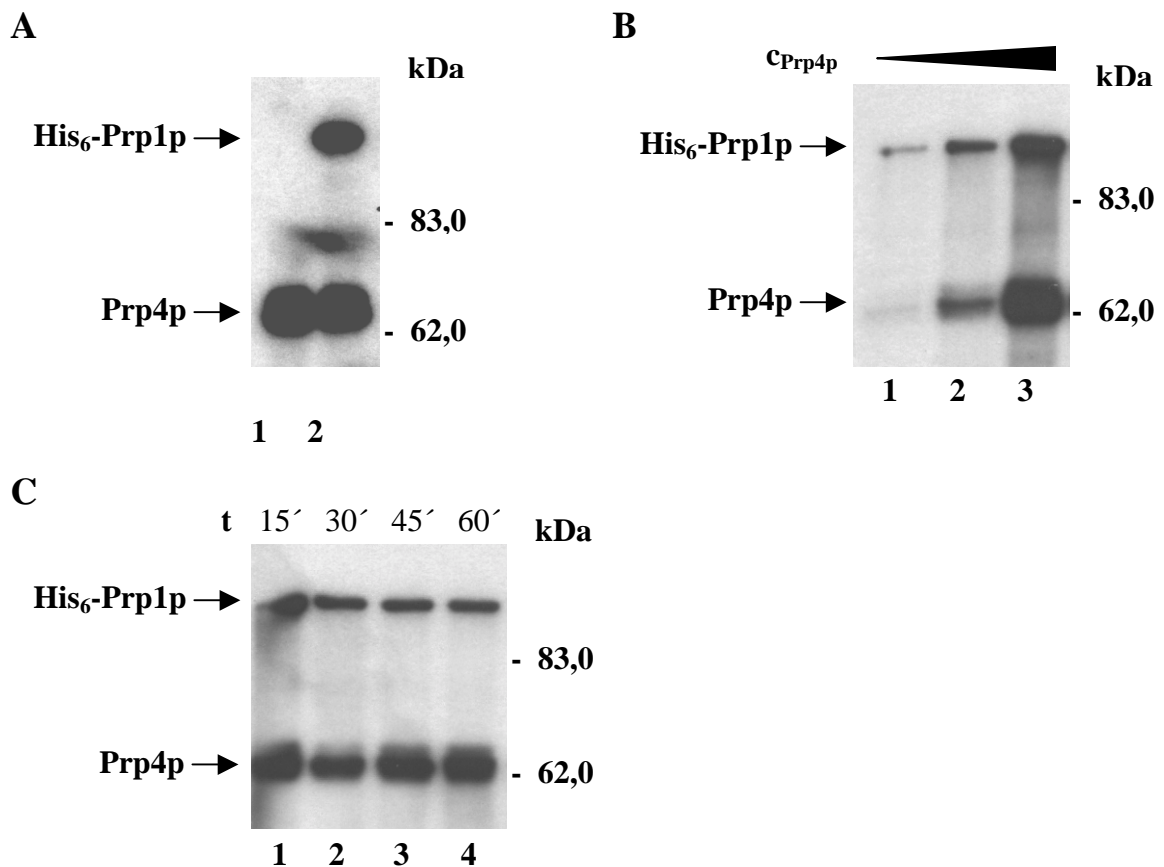
In den Spuren, in denen mit Prp4p-Kinase durchgeführte Kinaseassays aufgetragen wurden, ist im Bereich von 62 kDa eine Bande zu erkennen (Spur 2 - 5). Auch der anti-HA-Antikörper bindet in diesem Größenbereich an ein Protein (Abb. 3.3A, Spur 2 - 5), was darauf hindeutet, daß die Bande auf autophosphorylierte HA-Prp4p-Kinase zurückzuführen ist. In den Spuren der Ansätze, die mit Prp4p-K189I durchgeführt wurden, ist hingegen im Autoradiogramm kein Signal zu erkennen (Abb. 3.3B, Spur 6 und 7), obwohl das mutierte Protein im Western mit dem anti-HA-Antikörper nachweisbar ist (Abb. 3.3A, Spur 6 und 7). HA-Prp4p-K189I besitzt demnach keine Autophosphorylierungsaktivität, der Austausch des konservierten Lysins führt zur Inaktivierung der Kinase.

In den Ansätzen, in denen HA-Prp4p<sup>+</sup> mit steigenden Mengen His<sub>6</sub>-Prp1p inkubiert wurde, ist im Bereich von 100 kDa die Bande eines weiteren phosphorylierten Proteins zu sehen (Abb. 3.3B, Spur 3 - 5). Dieses Protein wird im Western durch den anti-<sub>4</sub>His-Antikörper erkannt (Abb. 3.3C, Spur 3 - 5), was dafür spricht, daß es sich dabei um phosphoryliertes His<sub>6</sub>-Prp1p handelt. Sowohl in der Negativkontrolle, in der das Substrat ohne Kinase inkubiert wurde, als auch in dem Ansatz, in der His<sub>6</sub>-Prp1p mit dem mutierten Protein Prp4p-K189I inkubiert wurde, ist keine Phosphorylierung von His<sub>6</sub>-Prp1p festzustellen (Abb. 3.3B und C, Spur 1 und 7). Damit ist der Nachweis erbracht, daß *in vitro* die Phosphorylierung von His<sub>6</sub>-Prp1p durch Prp4p erfolgt und nicht auf eine kopräzipitierende Kinase zurückzuführen ist.

Auch bakteriell exprimierte Prp4p-Kinase phosphoryliert His<sub>6</sub>-Prp1p [Schwelnus *et al.*, 2001]. Die in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 klonierte Kinase wurde in *E. coli* als Fusionsprotein mit dem Glutathion-S-Transferase(GST)-tag exprimiert [Opitz, 2001]. Die Bakterien wurden aufgeschlossen und der Zellextrakt über eine mit Glutathion-Sepharose gefüllte Säule gegeben. Die Bindung der Prp4p-Kinase an diese Säule erfolgte über den GST-tag, die übrigen Proteine passierten die Säule, ohne zu binden. Anschließend wurde Prp4p mit Hilfe der PreScission<sup>TM</sup>-Protease, deren Schnittstelle direkt hinter dem GST-tag liegt, von der Säule gelöst. Das Umpuffern von Prp4p in Kinasepuffer erfolgte mittels Ultrafiltration, wobei die Kinase gleichzeitig auf etwa 0,5 mg/ml konzentriert wurde. Aus einem Liter Bakterienkultur konnten ungefähr 2,5 mg Prp4p aufgereinigt werden.

Die Aktivität der aufgereinigten Kinase wurde mit und ohne His<sub>6</sub>-Prp1p als Substrat getestet. Abb. 3.4A zeigt das Autoradiogramm dieser Kinaseassays. In den Spuren beider Ansätze ist bei etwa 62 kDa eine Bande zu erkennen, die auf autophosphorylierte Prp4p-Kinase zurückzuführen ist (Abb. 3.4A, Spur 1 und 2). In dem Ansatz, in dem His<sub>6</sub>-Prp1p als Substrat zugegeben wurde, ist bei 100 kDa die Bande eines weiteren phosphorylierten Proteins zu erkennen

(Abb. 3.4A, Spur 2). Hierbei handelt es sich um His<sub>6</sub>-Prp1p. Wird eine konstante Menge His<sub>6</sub>-Prp1p mit steigenden Mengen Prp4p inkubiert, ist die Stärke des Phosphorylierungssignals in etwa der eingesetzten Kinasemenge proportional (Abb. 3.4B, Spur 1 – 3). Um die Inkubationszeit der Kinaseassays zu optimieren, wurden konstante Mengen beider Proteine für 15, 30, 45 bzw. 60 Minuten miteinander inkubiert. Die Intensität der Banden von phosphoryliertem His<sub>6</sub>-Prp1p und Prp4p ist in allen Ansätzen gleich (Abb. 3.4C, Spur 1 – 4), eine Verlängerung der Inkubationszeit über 15 Minuten hinaus führt nicht dazu, daß mehr Protein phosphoryliert wird. Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß bakteriell exprimierte Prp4p-Kinase sowohl Autokinase- als auch Kinaseaktivität besitzt [Schwelnus *et al.*, 2001]. Alle weiteren Versuche wurden mit der bakteriell exprimierten Prp4p-Kinase durchgeführt



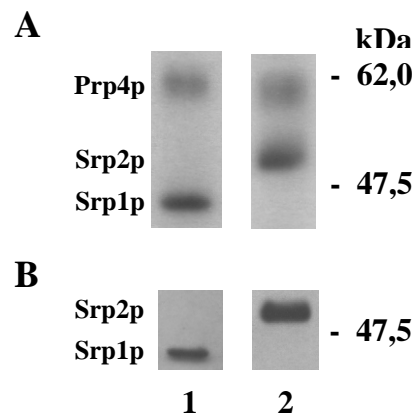
**Abb. 3.4:**

Autoradiogramme von Kinaseassays mit bakteriell exprimierter Prp4p-Kinase. (A) Spur 1: 1,0 µg Prp4p; Spur 2: 1,0 µg Prp4p + 1,0 µg His<sub>6</sub>-Prp1p. (B) Einfluß der Kinasemenge auf die Phosphorylierung von His<sub>6</sub>-Prp1p. Spur 1: 0,4 µg Prp4p + 0,6 µg His<sub>6</sub>-Prp1p; Spur 2: 0,8 µg Prp4p + 0,6 µg His<sub>6</sub>-Prp1p; Spur 3: 1,6 µg Prp4p + 0,6 µg His<sub>6</sub>-Prp1p. (C) Einfluß der Inkubationsdauer der Kinaseassays auf die Phosphorylierung von His<sub>6</sub>-Prp1p. Jeweils 0,8 µg Prp4p und 0,6 µg His<sub>6</sub>-Prp1p wurden für 15', 30', 45' bzw. 60' miteinander inkubiert.

### 3.3 Die Prp4p-Kinase phosphoryliert Srp1p und Srp2p *in vitro*

Prp1p ist nicht das einzige *in vitro*-Substrat der Prp4p-Kinase. Im Klassifizierungssystem für Proteinkinasen gehört Prp4p zur gleichen Gruppe wie die Clk- und SRPK-Kinasen [Hanks und Hunter, 1995; Hanks, 2003]. Dabei handelt es sich um Serin-/Threonin-Kinasen, die Spleißfaktoren aus der Familie der SR-Proteine phosphorylieren [Misteli *et al.*, 1998]. ASF/SF2 ist eines dieser SR-Proteine aus Mammalia. Es konnte gezeigt werden, daß Prp4p *in vitro* ASF/SF2 phosphoryliert [Groß *et al.*, 1997]. Mittlerweile wurden mit Srp1p und Srp2p zwei SR-Proteine aus *S. pombe* identifiziert [Groß *et al.*, 1998; Lützelberger *et al.*, 1999].

Um zu untersuchen, ob Srp1p und Srp2p *in vitro* von Prp4p phosphoryliert werden, wurden die beiden 31 kDa bzw 40 kDa großen Proteine fusioniert mit einem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli* produziert. Die aufgereinigten Proteine wurden mit bakteriell exprimierter Prp4p-Kinase in Anwesenheit von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Abb. 3.5A zeigt die Autoradiogramme der Kinaseassays. Neben der autophosphorylierten Kinase sind die Banden von Proteinen im Größenbereich von 50 kDa bzw. 45 kDa zu erkennen. Die Inkubation des Blots mit anti-<sub>4</sub>His-Antikörpern bestätigt, daß es sich dabei um phosphoryliertes His<sub>6</sub>-Srp1p bzw. His<sub>6</sub>-Srp2p handelt (Abb. 3.5B). Beide Proteine sind *in vitro*-Substrate von Prp4p.



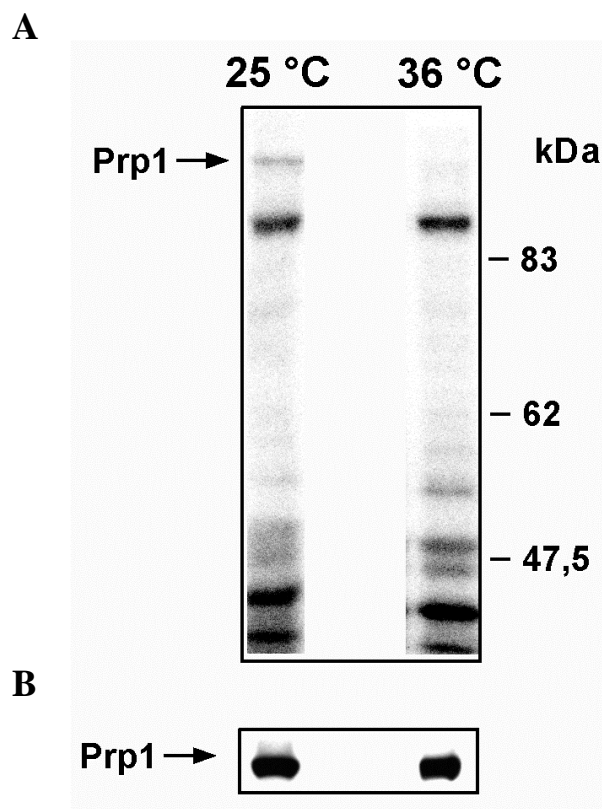
**Abb. 3.5:**

Phosphorylierung von bakteriell exprimiertem Srp1p und Srp2p durch Prp4p. Beide Proteine waren mit einem His<sub>6</sub>-tag versehen. Spur 1: 1,0 µg Prp4p + 4,0 µg Srp1; Spur 2: 1,0 µg Prp4p + 8,0 µg Srp2p. (A) Autoradiogramm der Kinaseassays. (B) Westernblot, inkubiert mit anti-<sub>4</sub>His-Antikörper.

### 3.4 Prp4p phosphoryliert Prp1p auch *in vivo*

Als nächstes sollte untersucht werden, ob Prp1p auch *in vivo* durch die Prp4p-Kinase phosphoryliert wird. Für diesen Versuch wurde der *S. pombe* Stamm 257 verwendet. Der Stamm besitzt das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel, das endogene *prp1<sup>+</sup>*-Gen sowie ein HA-getaggtetes *prp1<sup>+</sup>*-Gen, welches unter der Kontrolle des *nmt1-4*-Promotors steht und stabil in das Genom integriert wurde.

Für die radioaktive Markierung wurden Kulturen des Stamms 257 in phosphatreduziertem Medium angesetzt und bei 25 °C inkubiert. Nach der Zugabe von [<sup>32</sup>P]*ortho*-Phosphorsäure wurde ein Ansatz für weitere 4 Stunden bei 25 °C inkubiert, während ein anderer Ansatz über den gleichen Zeitraum bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inkubiert wurde. Die Zellen aus beiden Ansätzen wurden aufgeschlossen und die Proteine extrahiert. Aliquots der Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet.



**Abb. 3.6:**

*In vivo*-Markierung von HA-Prp1p. Der temperatursensitive Stamm 257, der das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel und ein mit dem HA-tag fusioniertes *prp1<sup>+</sup>*-Gen besitzt, wurden für 4 h bei 25 °C bzw. 36 °C mit [<sup>32</sup>P]*ortho*-Phosphorsäure inkubiert. Von den Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet wurden. (A) Autoradiogramm. Spur 1: Proteinextrakt von bei 25 °C inkubierten Zellen; Spur 2: Proteinextrakt von bei 36 °C inkubierten Zellen. (B) Western-Blot-Analyse mit anti-HA-Antikörpern.

Im Autoradiogramm ist im Extrakt der bei der permissiven Temperatur von 25 °C inkubierten Zellen im Größenbereich von 100 kDa die Bande eines phosphorylierten Proteins zu erkennen (Abb. 3.6A, Spur 1). Diese Bande ist im Extrakt der bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inkubierten Zellen kaum sichtbar (Abb. 3.6A, Spur 2). Mit Hilfe einer Westernblot-Analyse (Abb. 3.6B) konnte gezeigt werden, daß das Signal im Extrakt der bei 25 °C inkubierten Zellen auf phosphoryliertes Prp1p zurückzuführen ist. Das ist ein Hinweis darauf, daß Prp1p ein physiologisches Substrat der Prp4p-Kinase ist.

### 3.5 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen in Prp1p

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Prp1p von der Prp4-Kinase phosphoryliert wird, stellte sich die Frage nach den Konsequenzen dieser Phosphorylierung für die Regulation des prä-mRNA-Spleißens. Deshalb sollten *in vitro* die Phosphorylierungsstellen von Prp4p in Prp1p bestimmt werden, um diese mittels gerichteter Mutagenese mutieren zu können und die Auswirkungen dieser Mutationen in einem konditional letalem *S. pombe*-Stamm untersuchen zu können.

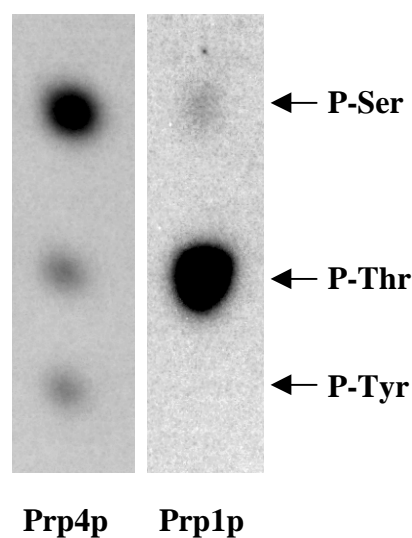
#### 3.5.1 Prp4p ist eine „dual specificity“ Kinase und phosphoryliert Prp1p an Threonin-Resten

Einige Serin-/Threonin-Kinasen können neben Serin- und Threonin-Resten auch Tyrosin-Reste phosphorylieren [Lee *et al.*, 1996]. Dieses unter „dual specificity“ bekannte Phänomen ist vor allem bei Autophosphorylierungsreaktionen *in vitro* zu beobachten [Hanks und Hunter, 1995]. Mit Hilfe einer Phosphoaminosäureanalyse von autophosphoryliertem Prp4p sollte geklärt werden, ob die Kinase auch Tyrosin phosphoryliert. Desweiteren sollte in einem ersten Schritt zur Identifizierung der Phosphorylierungsstellen eine Phosphoaminosäureanalyse von Prp1p durchgeführt werden. Diese sollte Aufschluß darüber bringen, welche Aminosäuren Prp4p *in vitro* in diesem Protein phosphoryliert.

Prp4p und His<sub>6</sub>-Prp1 wurden in Anwesenheit von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP miteinander inkubiert. Der Ansatz wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Phosphoryliertes Prp4p und His<sub>6</sub>-Prp1p wurden über Autoradiographie detektiert, die zugehörigen Banden aus dem Blot ausgeschnitten und in eine Trypsinlösung gegeben, um die Proteine von der Membran abzulösen. Die gelösten Peptide wurden lyophilisiert und anschließend durch Inkubation in HCl in ihre Aminosäuren zerlegt. Diese wurden lyophilisiert und in einem Puffer aufgenommen, in dem als Standard alle drei Phosphoaminosäuren gelöst waren. Die

Proben wurden auf eine Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Der Phosphoaminosäure-Standard wurde durch Besprühen der Platte mit Ninhydrinlösung sichtbar gemacht, anschließend erfolgte der Nachweis der radioaktiv markierten Aminosäuren mittels Autoradiographie.

Es zeigte sich, daß Prp4p nicht nur an Serin- und Threonin-Resten, sondern auch an Tyrosin-Resten autophosphoryliert wird (Abb.3.7). Prp4p besitzt demnach „dual specificity“ Aktivität. In His<sub>6</sub>-Prp1 werden hauptsächlich Threonin-Reste phosphoryliert, aber auch phosphoryliertes Serin ist in geringen Mengen nachweisbar.



**Abb. 3.7:**

Phosphoaminosäureanalysen von Prp4p und His<sub>6</sub>-Prp1p. Die phosphorylierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Nach ihrer Ablösung von der Membran mittels Trypsin wurden die Peptide durch Inkubation in 6 N HCl in ihre Aminosäuren zerlegt. Diese wurden über Elektrophorese aufgetrennt. Phosphorylierte Aminosäuren wurden mittels Autoradiographie nachgewiesen, die Laufhöhen des Phosphoaminosäure-Standards wurden eingezeichnet.

### 3.5.2 Abschätzung der Anzahl der Phosphorylierungsstellen in Prp1p

Um einen ersten Überblick über die Anzahl der Phosphorylierungsstellen in Prp1p zu erhalten, wurde ein „Phosphopeptidmap“ erstellt.

Die Methode des Phosphopeptidmappings auf Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatten bietet den Vorteil, daß sich die Anzahl der Phosphorylierungsstellen eines Proteins relativ schnell und einfach abschätzen läßt. Außerdem ist das Verfahren sehr sensitiv und schon geringe Proteinmengen von 0,2 - 1,0 nmol können analysiert werden. Die Bestimmung der Identität der phosphorylierten Peptide ist allerdings schwierig [Gracy, 1977; Quadroni und James, 2000; van der Geer *et al.*, 1993].



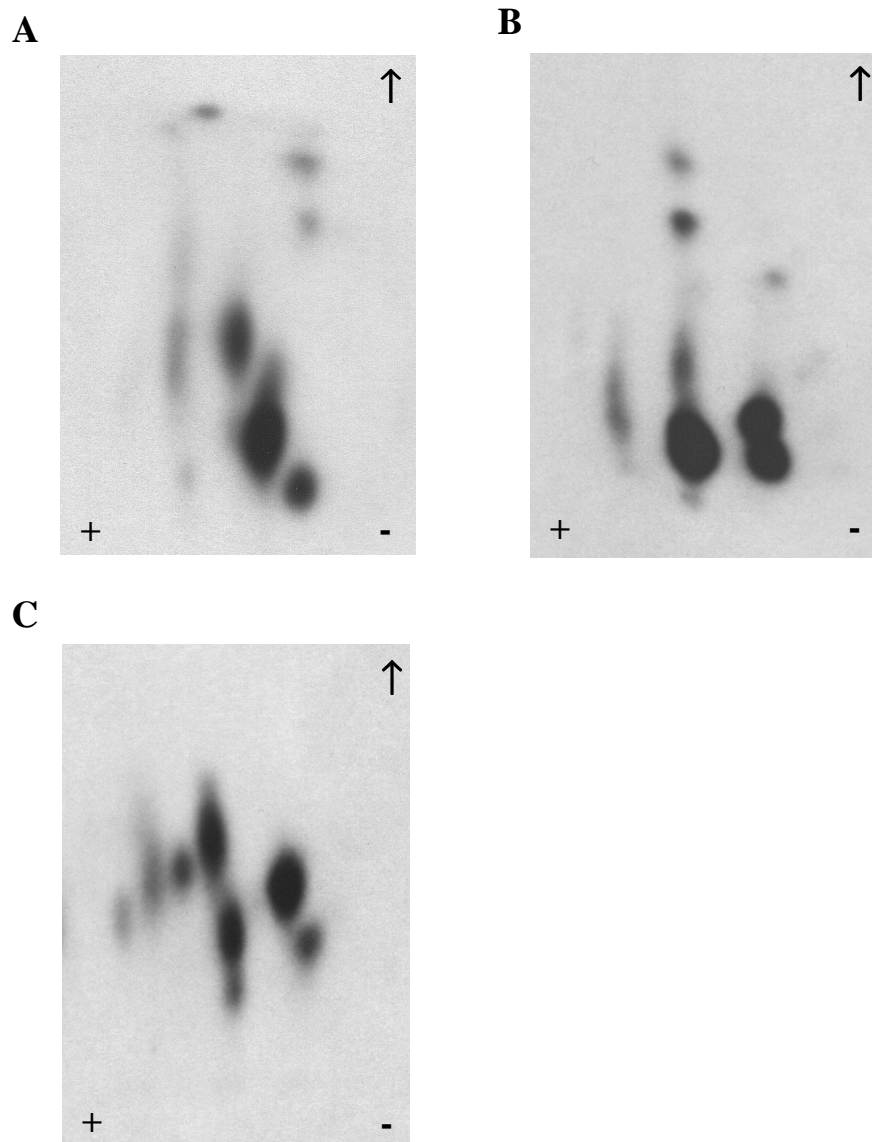
Für die Anfertigung eines Phosphopeptidmaps wird das zu untersuchende Protein *in vivo* oder *in vitro* in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP phosphoryliert. Anschließend wird das Protein mit Hilfe einer Protease gespalten. Die dabei erhaltenen Peptide werden in zwei Dimensionen auf Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatten aufgetrennt, wobei für die Auftrennung in der ersten Dimension eine Elektrophorese und für die in der zweiten Dimension eine Chromatographie durchgeführt wird. Phosphorylierte Peptide werden mittels Autoradiographie nachgewiesen [van der Geer *et al.*, 1993].

Nicht immer entspricht die Anzahl der im Autoradiogramm sichtbaren Spots auch der Anzahl der Phosphorylierungsstellen des Proteins. Wenn zwei oder mehr Schnittstellen einer Protease nahe zusammenliegen oder das Protein nicht vollständig gespalten wird, kann eine Phosphorylierungsstelle mehrere Spots im Autoradiogramm erzeugen. Zu wenig Spots können auftreten, wenn verschiedene Peptide in beiden Dimensionen das gleiche Laufverhalten zeigen [Affolter *et al.*, 1994]. Deshalb wurden Parallelansätze mit verschiedenen Proteasen durchgeführt.

Phosphoryliertes His<sub>6</sub>-Prp1p wurde mit Trypsin, Chymotrypsin bzw. Endoproteinase Glu-C gespalten. Unter den verwendeten Bedingungen spaltet Trypsin Proteine direkt nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Chymotrypsin spaltet nach Phenylalanin, Tryptophan sowie Tyrosin und die Endoproteinase Glu-C spaltet nach Glutaminsäure [van der Geer *et al.*, 1993]. Bei vollständiger Spaltung wird His<sub>6</sub>-Prp1p von Trypsin in 80 Peptide gespalten, von Chymotrypsin in 48 und von Endoproteinase Glu-C in 40. Die Peptide wurden auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen und mittels Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt. Phosphorylierte Peptide wurden über Autoradiographie nachgewiesen.

Wenn His<sub>6</sub>-Prp1p mit Trypsin gespalten wurde, sind drei stark und drei schwach phosphorylierte Peptide zu erkennen (Abb. 3.8A). Mit Chymotrypsin gespaltenes His<sub>6</sub>-Prp1p liefert ein ähnliches Bild: neben drei stark phosphorylierten Peptiden lassen sich drei oder vier schwächer phosphorylierte Peptide nachweisen (Abb. 3.8B). Ein komplexeres Muster zeigt das Autoradiogramm von Endoproteinase Glu-C behandeltem His<sub>6</sub>-Prp1p: Hier sind neben den Spots von drei stark und zwei schwach phosphorylierten Peptiden drei weitere Spots zu erkennen (Abb. 3.8C).

Unabhängig von der verwendeten Protease sind damit in den Phosphopeptidmaps von *in vitro* phosphoryliertem His<sub>6</sub>-Prp1p die Spots von drei stark phosphorylierten Peptiden nachweisbar. Damit läßt sich auch unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Einschränkungen bei der Interpretation von Phosphopeptidmaps sagen, daß es mindestens drei Phosphorylierungsstellen der Prp4p-Kinase in His<sub>6</sub>-Prp1p gibt.

**Abb. 3.8:**

Phosphopeptidmaps von His<sub>6</sub>-Prp1p. Das Protein wurde in Anwesenheit von <sup>32</sup>P-γATP *in vitro* durch Prp4p phosphoryliert. Anschließend wurde es mit Hilfe verschiedener Proteasen ((A) Trypsin; (B) Chymotrypsin; (C) Endoproteinase Glu-C) gespalten. Die Peptide wurden auf Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen und mittels Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt. Die Orientierung der positiven (+) und negativen (-) Elektroden sowie die Laufrichtung des Chromatographiepuffers (→) sind eingezeichnet.

### 3.5.3 Suche nach den Prp1p-Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie können nicht nur Proteine identifiziert werden, sondern auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen nachgewiesen werden. Dazu muß die Aminosäuresequenz des Proteins bekannt sein. Es wird eine Liste mit den theoretischen Massen der Peptide angefertigt, die bei der Spaltung dieses Proteins mit einer bestimmten Protease entstehen. Diese Liste wird mit den Peptidmassen verglichen, die nach der proteolytischen Spaltung des Proteins tatsächlich im Massenspektrum auftreten. Alle Peptide, die im Massenspektrum eine um 79 Da höhere Masse als die von der Sequenz her zu erwartende aufweisen, liegen wahrscheinlich in phosphorylierter Form vor [Mann *et al.*, 2002; Neubauer und Dreger, 1999].

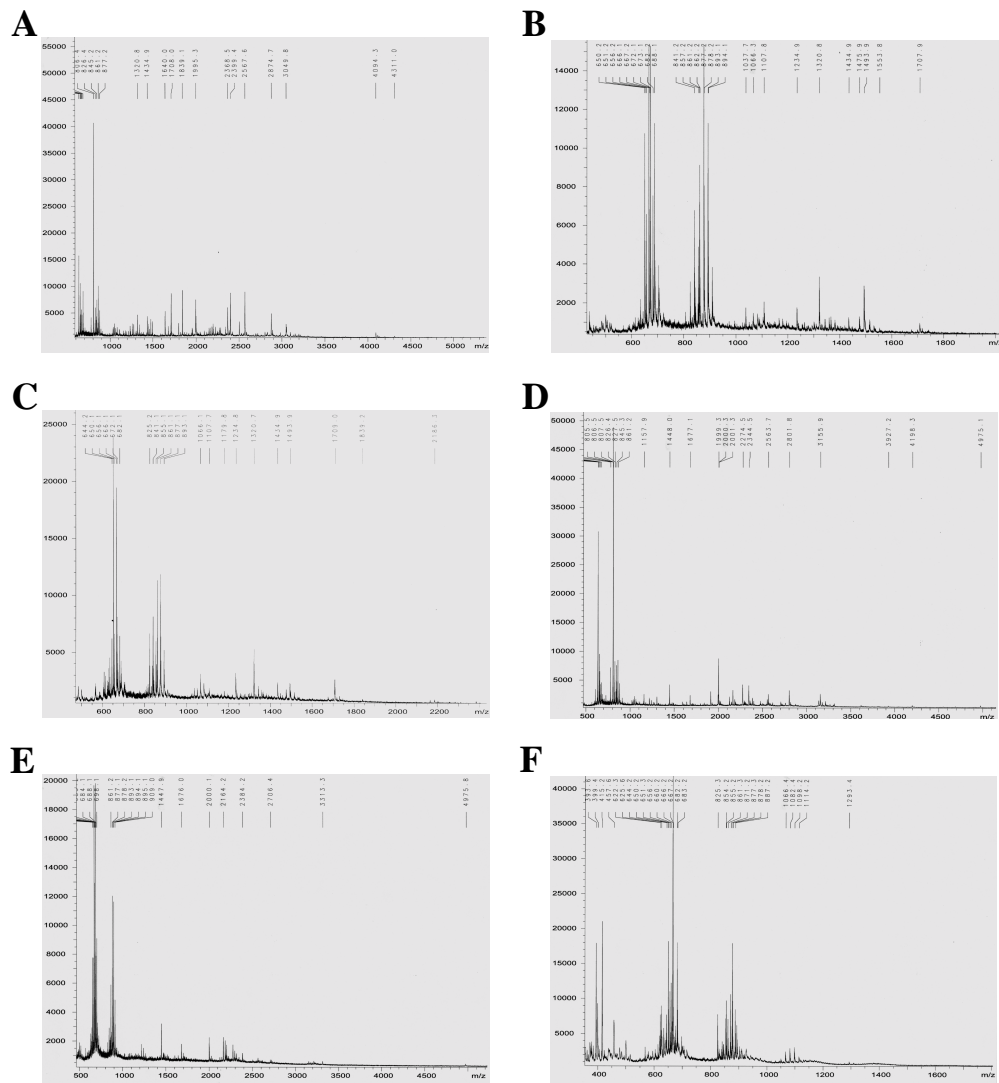
Die Phosphorylierungsstellen von Prp1p sollten mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Dazu wurden 2 µg His<sub>6</sub>-Prp1p mit Prp4p-Kinase phosphoryliert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Protein wurde im Gel mit Trypsin gespalten und die Peptide eluiert. Sie wurden entweder direkt mittels Massenspektrometrie analysiert oder zuvor verdünnt bzw. unverdünnt mit Hilfe einer „reversed phase“-Säule entsalzt. Als Kontrolle wurden Massenspektren von His<sub>6</sub>-Prp1p aufgenommen, das nicht phosphoryliert wurde. Abb. 3.9 zeigt die Spektren. Es wurden Peptide im Größenbereich von ca. 600 - 3500 Da detektiert.

Theoretisch entstehen bei der Spaltung von Prp1p mit Trypsin 67 Peptide mit einer Masse von mehr als 600 Da. Die Sequenz und Masse dieser Peptide sind der Tabelle im Anhang zu entnehmen. In Tabelle 3.1 sind die Prp1p-Peptide aufgelistet, die in den Spektren von His<sub>6</sub>-Prp1p identifiziert werden konnten. Dabei wurden ausschließlich einfach geladene Peptidionen  $[M+H]^+$  berücksichtigt.

In den Spektren von His<sub>6</sub>-Prp1p lassen sich die Peaks von 23 Peptiden nachweisen, die durch die Proteolyse des Proteins mit Trypsin entstehen, in den Spektren von His<sub>6</sub>-Prp1p, das mit Prp4p inkubiert wurde, lediglich 17 (Tab. 3.1A und B). Damit wurden nur 34 % bzw. 24 % der tryptischen Prp1-Peptide detektiert.

In allen Spektren lassen sich Peptide nachweisen, die eine um 79 Da größere Masse haben, als die tryptischen Prp1p-Peptide. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine phosphorylierte Form dieser Peptide. In den Spektren von His<sub>6</sub>-Prp1p können die Peaks von acht phosphorylierten Prp1p-Peptiden detektiert werden, in den Spektren von His<sub>6</sub>-Prp1p, das mit Prp4p-Kinase inkubiert worden war, nur vier. Peptide, die schon im Kontrollspektrum eine 79 Da größere Masse besitzen, werden vermutlich von *E. coli* Kinasen phosphoryliert. Es gibt damit nur ein Peptid (DAYLAGTK + Ⓢ, Tab. 3.1B), das als potentielle Phosphory-

lierungsstelle in Frage kommt. Allerdings wurde dieses Peptid bei einer Wiederholung des Versuchs auch im Kontrollspektrum von His<sub>6</sub>-Prp1p in phosphorylierter Form nachgewiesen, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.



**Abb. 3.9:**

Maldi-Spektren von (A) His<sub>6</sub>-Prp1p. (B) His<sub>6</sub>-Prp1p, das mittels ZipTip entsalzt wurde. (C) His<sub>6</sub>-Prp1p, das 1 : 10 verdünnt und mittels ZipTip entsalzt wurde. (D) phosphoryliertem His<sub>6</sub>-Prp1p. (E) phosphoryliertem His<sub>6</sub>-Prp1p, das mittels ZipTip entsalzt wurde. (F) phosphoryliertem His<sub>6</sub>-Prp1p, das 1 : 10 verdünnt und mittels ZipTip entsalzt wurde.

**Tab. 3.1:**A) in den Massenspektren von nichtphosphoryliertem His<sub>6</sub>-Prp1p detektierte Massen tryptischer Prp1p-Peptide.

theoret. Masse	gemessene Masse	Position	Spektrum	Peptidsequenz
635,4	635,3	733 - 737	B	VVFDR
646,4	646,5	799 - 804	A	ATDALR
685,3	685,2	681 - 685	B	LYMMK
733,4	733,5	570 - 576	B	AVESCPK
791,4	791,4	640 - 646	B und C	IESGTER
802,4	802,5	287 - 293	B	LEEVANK
827,5	827,4	329 - 336	B	VIIANAVK
836,4	836,3	686 - 692	C	GQIFEDK
836,5	836,5	321 - 328	B	LHPAAEAK
838,4	838,5	700 - 707	B	DAYLAGTK
910,5	910,6	531 - 538	A	AVFAFSLR
967,5	967,5	413 - 420	B	LETYENAK
967,5		351 - 358		LENQAQHK
994,5	994,6	126 - 134	B	VSSQFADLK
1025,5	1025,6	277 - 286	A	HASGWVAAAR
1077,6	1077,7	207 - 216	B und C	TNFVEIGAAR
1217,6	1217,7	311 - 320	C	SEDVWLEAIR
1240,6	1240,8	323 - 342	A, B und C	TSHEVWIAAAR
1241,7	1241,8	266 - 276	B	LLQSVIETNPK
1446,7	1446,9	460 - 473	B	GVSELQATGGMLQR
1447,7	1447,9	168 - 180	C	FYATSDFVLASAR
1729,9	1730	224 - 240	A und C	LAQASSNLTSPSTIDPK
2399,2	2399,2	136 - 156	A und B	ALQECPSGGLWTEAIWLEPR
725,4	725,5	799 - 804	B	ATDALR + ②
759,3	759,5	831 - 835	B	SWFLK + ②
847,3	847,3	304 - 310	B	GCENCSR + ②
870,4	870,5	640 - 646	A	IESGTER + ②
1074,5	1074,6	126 - 134	A	VSSQFADLK + ②
1179,7	1179,8	294 - 303	A, B und C	LSQAQSLILK + ②
1254,6	1254,7	341 - 350	A und B	SVTLWLEAEK + ②
1320,7	1320,7	266 - 276	B und C	LLQSVIETNPK + ②

B) in den Massenspektren von phosphoryliertem His<sub>6</sub>-Prp1p detektierte Massen tryptischer Prp1p-Peptide.

theoret. Masse	gemessene Masse	Position	Spektrum	Peptidsequenz
602,4	602,6	726 - 730	D	QSVIR
680,3	680,2	831 - 835	F	SWFLK
687,4	687,4	48 - 53	E	AAIEQR
836,4	836,5	321 - 328	E	LHPAAEAK
910,5	910,7	531 - 538	D	AVFAFSLR
1025,5	1025,5	277 - 286	D und E	HASGWVAAAR
1077,6	1077,7	207 - 216	D und E	TNFVEIGAAR
1175,6	1175,8	341 - 350	D	SVTLWLEAEK
1217,6	1217,8	311 - 320	E	SEDVWLEAIR
1240,8	1240,6	432 - 442	E	TSHEVWIAAAR
1263,6	1263,7	621 - 630	E	IEFVNNENER
1304,7	1304,9	745 - 754	D	NEFLWLELIK
1446,7	1446,9	460 - 473	E	GVSELQATGGMLQR
1487,7	1487,8	378 - 390	E	EQVNLEEEVDNAR
1688,9	1699,0	32 - 47	E	SDLGPAQELPSQESIK
2562,2	2562,2	865 - 886	E	EVLTSEFETADPHHGYFWPSITK
2612,2	2612,3	1 - 23	E	MANFYPDFLMNQPPPNYVAGLGR
725,4	725,4	799 - 804	E	ATDALR + Ⓟ
917,4	917,2	700 - 707	F	DAYLAGTK + Ⓟ
1179,7	1179,8	294 - 303	E und F	LSQAQSLILK + Ⓟ
1320,7	1320,9	266 - 276	D	LLQSVIETNPK + Ⓟ

### 3.5.4 Suche nach den Prp1p-Phosphorylierungsstellen mittels einer Prp1-Peptidbibliothek

Versuche mit mehreren Serin/Threonin-Kinasen haben gezeigt, daß für die Substraterkennung die Primärsequenz direkt um die Phosphorylierungsstelle eine entscheidende Rolle spielt. Diese Erkennungsmotive, die oft stark degeneriert sind, umfassen in den meisten Fällen zwischen sechs und zwölf Aminosäuren [Kemp und Pearson, 1990]. In einigen Fällen konnten sie mit Hilfe von Peptidbibliotheken bestimmt werden [Songyang und Cantley, 1999; Tegge und Frank, 1998].

Die Phosphorylierungsstellen von Prp4p in Prp1p sollten mit Hilfe einer Prp1-Peptidbibliothek identifiziert werden. Dazu wurden 25 Peptide synthetisiert, die je 15 Aminosäuren lang waren. Ihre Sequenz wurde aus der Prp1p-Sequenz abgeleitet. Da die Phosphoamino-

säureanalyse ergeben hatte, daß Prp4p in Prp1p hauptsächlich Threonin-Reste phosphoryliert, wurde darauf geachtet, daß alle 41 in Prp1p enthaltenen Threonine in den Peptiden vorkommen. Die Sequenzen der Peptide sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

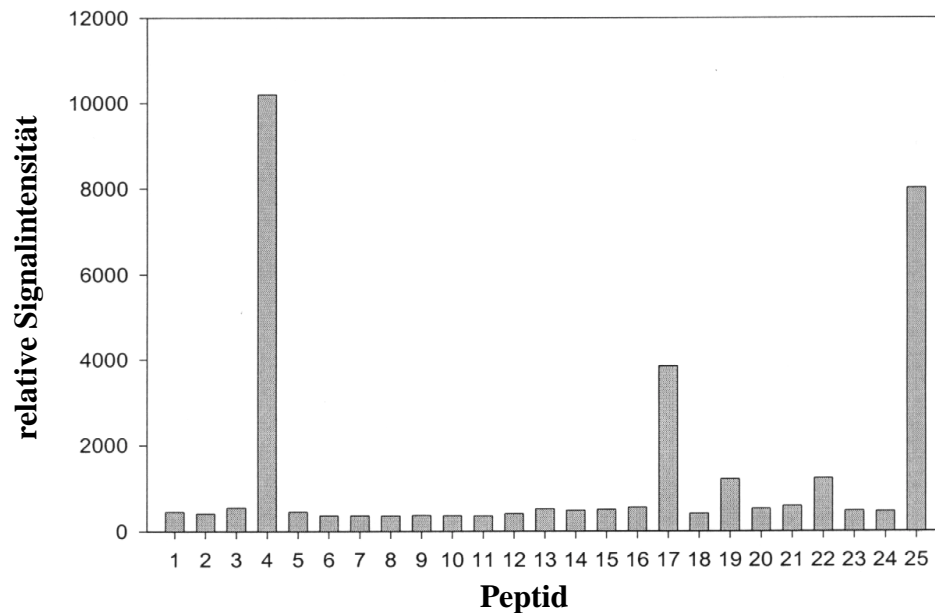
**Tab. 3.2:**

Peptidsequenzen der Prp1p-Peptidbibliothek. Die Serine und Threonine innerhalb der Sequenzen wurden hervorgehoben und die Position der Peptide in der Prp1p-Sequenz (s. 7.1) wurde angegeben.

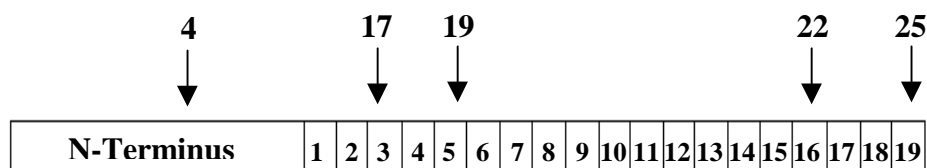
Spot	Peptidsequenz	Position	Spot	Peptidsequenz	Position
1	LGRGATG <b>F</b> <b>T</b> TRSDLG	21 - 35	14	<b>A</b> SSN <b>L</b> <b>T</b> SP <b>S</b> TIDPKG	227 - 241
2	EVALFAT <b>A</b> PYDHEDE	73 - 87	15	IDPKG <b>Y</b> L <b>T</b> SLNSMVP	137 - 251
3	KRGL <b>S</b> <b>T</b> L <b>T</b> DEDWNNI	134 - 148	16	LLQSV <b>I</b> ETNP <b>K</b> HASG	266 - 280
4	EPGDL <b>T</b> RKKR <b>T</b> KQPR	150 - 164	17	KKLP <b>K</b> SV <b>T</b> LWLEAEK	336 - 350
5	RERFYAT <b>S</b> DFVLASA	167 - 181	18	KALEFN <b>P</b> <b>T</b> SV <b>S</b> LWKE	364 - 378
6	FAVD <b>T</b> QAG <b>T</b> ETPD <b>M</b> N	189 - 203	19	LALAR <b>L</b> ET <b>Y</b> ENAKKV	408 - 422
7	<b>T</b> ETPD <b>M</b> NG <b>T</b> K <b>T</b> NFVE	197 - 211	20	NKAR <b>Q</b> <b>T</b> IR <b>T</b> SEHV <b>I</b>	424 - 438
8	GVSELQATGGMLQ <b>R</b> D	460 - 474	21	RDAYLAG <b>T</b> KVCP <b>Y</b> <b>S</b> <b>I</b>	699 - 713
9	SEAEKC <b>E</b> TEGAV <b>I</b> T <b>A</b>	478 - 492	22	RAQR <b>K</b> TRATDALR <b>K</b> C	792 - 806
10	<b>T</b> AQAI <b>I</b> NTCLGVGLD	491 - 505	23	GNAHLL <b>C</b> <b>T</b> IARMLWL	808 - 822
11	DEEDQFD <b>T</b> WLDDA <b>Q</b> S	505 - 519	24	QKEVL <b>T</b> S <b>F</b> ETADPHH	863 - 877
12	LEKLQ <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b> ESVCS <b>I</b> L	535 - 549	25	<b>P</b> S <b>I</b> <b>T</b> KDIK <b>N</b> SRK <b>T</b> P <b>Q</b>	882 - 896
13	RIES <b>G</b> TERIW <b>T</b> K <b>S</b> <b>I</b> S	639 - 653			

Die Peptide wurden über einen Linker aus zwei Aminosäuren an einen Streifen aus Cellulose-Chromatographiepapier gekoppelt (Frank und Overwin, 1996). Dieser Streifen wurde in einem Puffer mit Prp4p und [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP inkubiert. Anschließend wurde er gewaschen und getrocknet. Mit Hilfe eines PhosphorImagers wurde die Radioaktivität der einzelnen Peptid-Spots bestimmt (Abb. 3.10A).

In Abb. 3.10B ist die auf den einzelnen Spots zu messende Radioaktivität quantitativ dargestellt: sie liegt bei 5 der 25 Peptide über dem Durchschnitt. Die stärksten Signale liefern die Peptide 4 und 25 (Abb. 3.10B und C). Sie liegen im N-terminalen Bereich des Proteins bzw. in TPR19 (Abb. 3.10D). Auch das Peptid 17, welches in TPR3 liegt, zeigt ein deutliches Signal (Abb. 3.10A und B). Wesentlich schwächere Signale ergeben die Peptide 19 und 22, welche an der Grenze der TPRs 5 und 6 bzw. in TPR 16 liegen (Abb. 3.10A - D).

**A****B****C**

**4:** EPGDLTRKKRTKQPR (150 – 164)  
**17:** KKLPKSVTLWLEAEK (336 – 350)  
**19:** LALARLETYENAKKV (408 – 512)  
**22:** RAQRKTRATDALRKC (792 – 806)  
**25:** PSITKDIKNSRKTPQ (882 – 896)

**D****Abb. 3.10:**

Suche nach den Prp1p-Phosphorylierungsstellen mittels einer an einen Cellulosestreifen gekoppelten Prp1-Peptidbibliothek. (A) PhosphorImager-Bild des Streifens nach der Inkubation mit Prp4p und  $^{32}\text{P}$ - $\gamma\text{ATP}$ . (B) Quantitative Darstellung der für die einzelnen Spots erhaltenen Signalintensitäten. Die Höhe der Säulen ist der Radioaktivitätsmenge des entsprechenden Spots direkt proportional (C) Sequenz der Peptide, die überdurchschnittliche Signalintensitäten zeigten. Theoretisch phosphorylierbare Aminosäuren wurden unterstrichen. Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren in Prp1p an. (D) Lage der Peptide in Prp1p. Die TPR-Motive im C-Terminus sind durch Kästchen angedeutet.



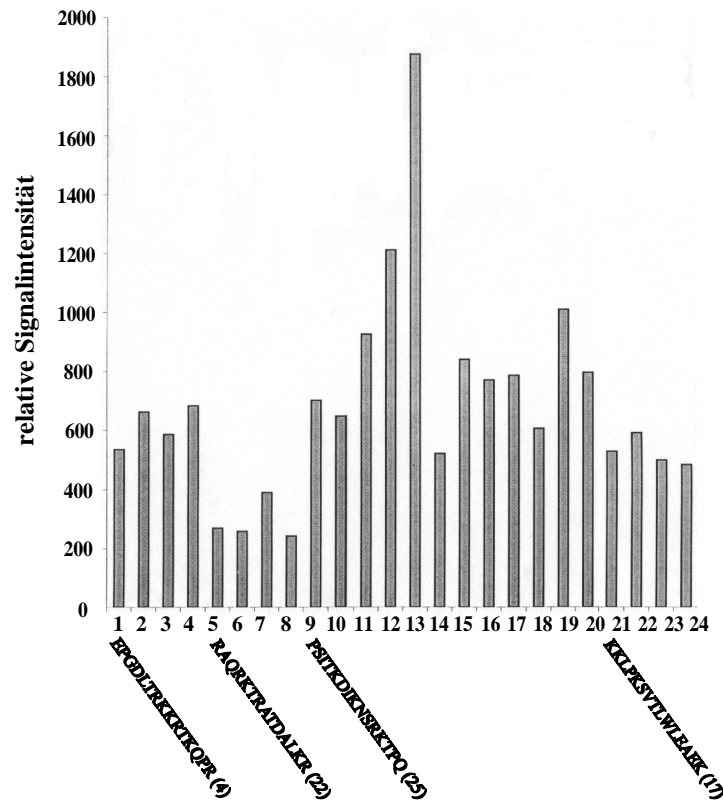
Die fünf Peptide, die erhöhte Signalintensität aufwiesen, enthalten zum Teil mehrere Serine und Threonine (Abb. 3.10C). Um zu überprüfen, ob die Signale durch die Übertragung eines Phosphatrestes auf eine oder mehrere der phosphorylierbaren Aminosäuren zurückzuführen sind, wurden Variationen dieser Peptide synthetisiert. Die phosphorylierbaren Aminosäuren wurden dabei einzeln oder in Kombination gegen Alanine ausgetauscht (Tab. 3.3). Diese variierten Peptide wurden neben ihrem Ausgangspeptid (Abb. 3.11, Position 1, 4, 9 und 21) an einen Cellulosestreifen gekoppelt und zusammen mit Prp4p und  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  inkubiert. Abb. 3.11 zeigt die quantitative Darstellung des PhosphorImager-Bildes.

Die Signale der variierten Peptide unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Ausgangs-peptide. Das spricht dagegen, daß sie auf Phosphorylierung einzelner Aminosäuren zurückzuführen sind. Es ist möglich, daß  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  unspezifisch an die Peptide bindet und dadurch die Signale verursacht. Eine weitere Möglichkeit ist, daß Prp4p die Peptide nicht phosphoryliert, aber an sie bindet. Die Signale sind dann auf die Autophosphorylierung der Kinase zurückzuführen.

**Tab. 3.3:**

Sequenzen der Peptide mit erhöhter Signalintensität und der davon abgeleiteten Peptidvarianten. Die Serine und Threonine innerhalb der Sequenzen wurden hervorgehoben. Die Position der Ausgangs-peptide in der Prp1-Sequenz wurde angegeben.

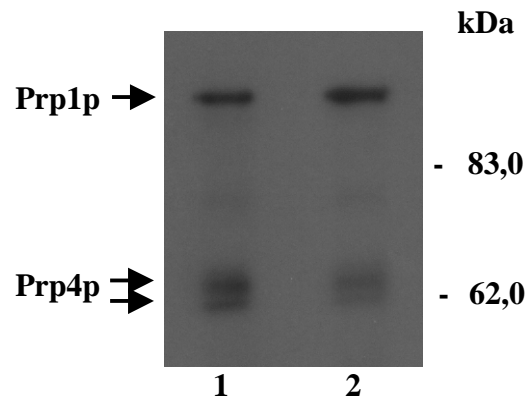
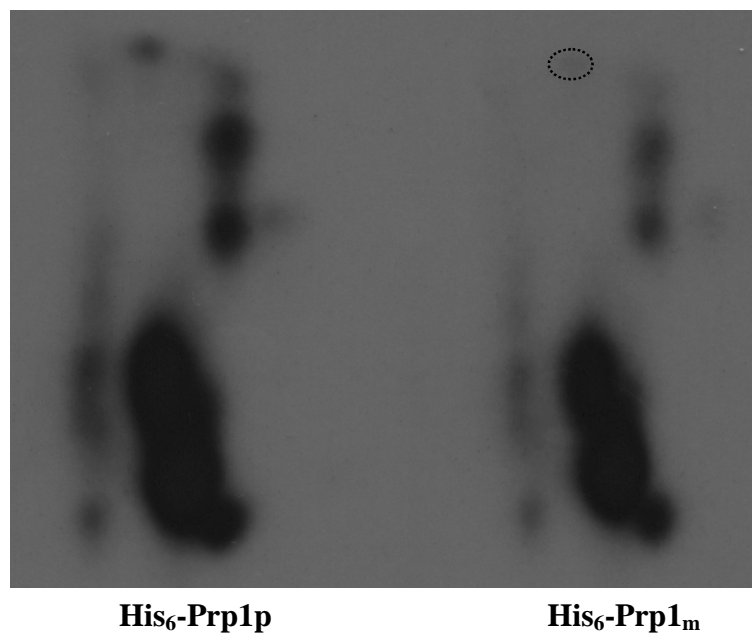
Spot	Peptidsequenz	Position	Spot	Peptidsequenz	Position
1	EPGDL <b>TR</b> KKR <b>TK</b> QPR	150 - 164	13	P <b>S</b> IT <b>K</b> DIK <b>NS</b> RKAPQ	336 - 350
2	EPGDLARKKR <b>TK</b> QPR		14	PAIAKDIK <b>NS</b> RK <b>TP</b> Q	
3	EPGDL <b>TR</b> KKRAKQPR		15	P <b>S</b> IAKDIKNARK <b>TP</b> Q	
4	EPGDLARKKRAKQPR		16	P <b>S</b> IT <b>K</b> DIKNARKAPQ	
5	RAQRK <b>TR</b> ATD <b>AL</b> RKC	792 - 806	17	P <b>S</b> IAKDIK <b>NS</b> RKAPQ	
6	RAQRKARATD <b>AL</b> RKC		18	P <b>S</b> IT <b>K</b> DIKNARKAPQ	
7	RAQRK <b>TR</b> AAD <b>AL</b> RKC		19	P <b>S</b> IAKDIK <b>NS</b> RK <b>TP</b> Q	
8	RAQRKARAAD <b>AL</b> RKC		20	PAIAKDIKNARKAPQ	
9	P <b>S</b> IT <b>K</b> DIK <b>NS</b> RK <b>TP</b> Q	882 - 896	21	KKLPK <b>SV</b> TLWLEAEK	
10	PAIT <b>K</b> DIK <b>NS</b> RK <b>TP</b> Q		22	KKLPKAV <b>TL</b> WLEAEK	
11	P <b>S</b> IAKDIK <b>NS</b> RK <b>TP</b> Q		23	KKLPK <b>S</b> VALWLEAEK	
12	P <b>S</b> IT <b>K</b> DIKNARK <b>TP</b> Q		24	KKLPKAVALWLEAEK	



**Abb. 3.11:**

Untersuchung, ob die Signale der Peptide 4, 17, 22 und 25 aus Abb. 7B auf Übertragung eines Phosphatrestes auf eine der phosphorylierbaren Aminosäuren zurückzuführen sind. Dazu wurden diese Peptide in der ursprünglichen Sequenz (Position 1, 5, 9 und 22) bzw. in variierte Form (Position 2 – 4, 6 – 8, 10 – 20 und 22 – 24) an einen Cellulosestreifen gekoppelt und mit Prp4p und  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  inkubiert. Die Höhe der Säulen ist der an den einzelnen Positionen gemessenen Radioaktivitätsmenge direkt proportional.

Gleichzeitig mit den oben beschriebenen Versuchen wurden mit Hilfe gerichteter Mutagenese [Kunkel *et al.*, 1987] alle acht Threonine aus den 5 Peptiden in Alanin umgewandelt, um zu überprüfen, ob das mutierte Protein noch von der Prp4p-Kinase phosphoryliert werden kann. Die Sequenzen der für die Mutagenese eingesetzten Oligonucleotide sind der Tabelle 5.5 zu entnehmen. Die mutierte *prp1*-cDNA kodiert für das Protein His<sub>6</sub>-Prp1(T155A/T160A/T343A/T415A/T797A/T800A/T885A/T894A). Es wird im folgenden His<sub>6</sub>-Prp1<sub>m</sub> genannt. Die cDNA wurde in den Expressionsvektor pQE31 kloniert, um das Protein fusioniert mit einem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli* exprimieren zu können. His<sub>6</sub>-Prp1<sub>m</sub> wurde über den His<sub>6</sub>-tag aus Bakterien-Extrakten aufgereinigt und zusammen mit Prp4p in Anwesenheit von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  inkubiert. In einem Kontrollansatz wurde His<sub>6</sub>-Prp1p mit Prp4p phosphoryliert. Die Kinaseassays wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Abb. 3.12A zeigt das Autoradiogramm der Kinaseassays. Auch das mutierte His<sub>6</sub>-Prp1<sub>m</sub> wird phosphoryliert.

**A****B****Abb. 3.12:**

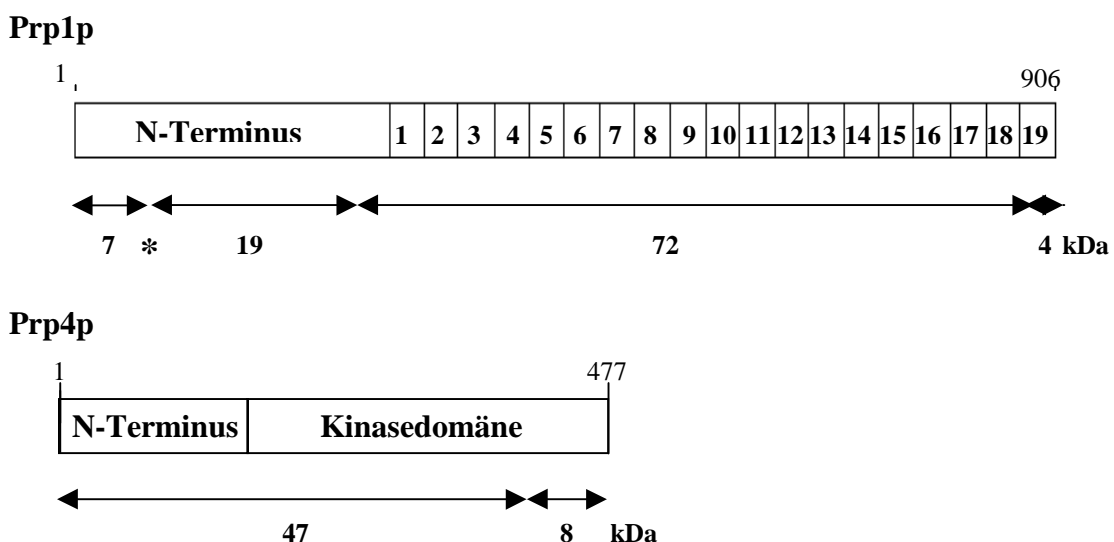
Test, ob das mutierte His<sub>6</sub>-Prp1<sub>m</sub> phosphoryliert wird. Jeweils 0,8 µg Substrat wurden mit 1 µg Prp4p in Anwesenheit von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. (A) Autoradiogramm der Kinaseassays. Spur 1: 0,8 µg His<sub>6</sub>-Prp1p und 1,0 µg Prp4p; Spur 2: 0,8 µg His<sub>6</sub>-Prp1<sub>m</sub> und 1,0 µg Prp4p. (B) Phosphopeptidmaps von His<sub>6</sub>-Prp1p und His<sub>6</sub>-Prp1<sub>m</sub>. Beide Proteine wurden mit Trypsin gespalten. Die Peptide wurden auf eine Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und mittels Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt.

Von His<sub>6</sub>-Prp1p und His<sub>6</sub>-Prp1<sub>m</sub> wurden Phosphopeptidmaps angefertigt, wobei die Proteinspaltung mit Trypsin durchgeführt wurde. Die Auftrennung der Peptide ergibt für beide Proteine ein identisches Muster phosphorylierter Peptide (Abb. 3.12B). Das bedeutet, daß keins von den Peptiden aus Abb. 3.10C in Prp1p *in vitro* durch die Prp4p-Kinase phosphoryliert wird.

### 3.5.5 Die Phosphorylierungsstellen von Prp1p liegen innerhalb eines ca. 19,1 kD großen Abschnitts des Proteins

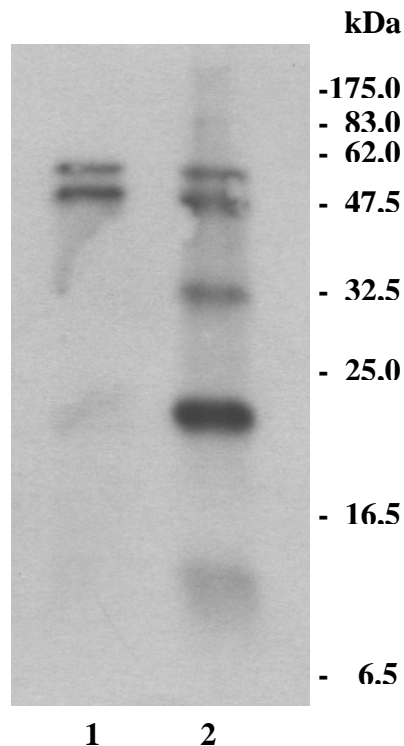
Für weitere Ansätze zur Identifizierung der Phosphorylierungsstellen in Prp1p wäre es hilfreich zu wissen, ob sie über das gesamte Protein verteilt sind, oder innerhalb eines bestimmten Bereiches liegen. Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin spalten das Protein in mehr als 50 Peptide. Viele dieser Peptide sind nur wenige Aminosäuren lang und lassen sich deshalb in einem SDS-Gel nicht darstellen. Neben der proteolytischen Spaltung von Proteinen gibt es auch die Möglichkeit, mit Hilfe von Chemikalien sequenzspezifisch zu spalten. Zum Beispiel läßt sich die Bindung zwischen den beiden Aminosäuren Asparaginsäure und Prolin durch Inkubation des Proteins in 70 %iger Ameisensäure spezifisch hydrolysieren [van der Geer *et al.*, 1999; Landon, 1977; Mahboub *et al.*, 1986]. In Prp1p tritt die Aminosäurefolge Asparaginsäure-Prolin vier mal auf, in Prp4p nur ein mal. Die Position dieser Dipeptide im Protein und die Größe der durch Spaltung mit Ameisensäure entstehenden Fragmente sind der Abb. 3.13 zu entnehmen.

Um zu untersuchen, welche der Peptide phosphoryliert werden, wurden His<sub>6</sub>Prp1p und Prp4p in Anwesenheit von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP inkubiert. In einem Kontrollansatz wurde Prp4p ohne Substrat inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit Ameisensäure behandelt und die Peptide in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde auf Nitrocellulose geblottet. Abb. 3.14 zeigt das Autoradiogramm.



**Abb. 3.13:**

Lage und Größe der durch Spaltung mit Ameisensäure entstehenden Prp1p- und Prp4p-Peptide. Die TPR-Motive in Prp1p sind durch Kästchen angedeutet. Das Sternchen steht für ein 5 Aminosäuren langes Peptid in Prp1p, das bei der Spaltung mit Ameisensäure entsteht.

**Abb.3.14:**

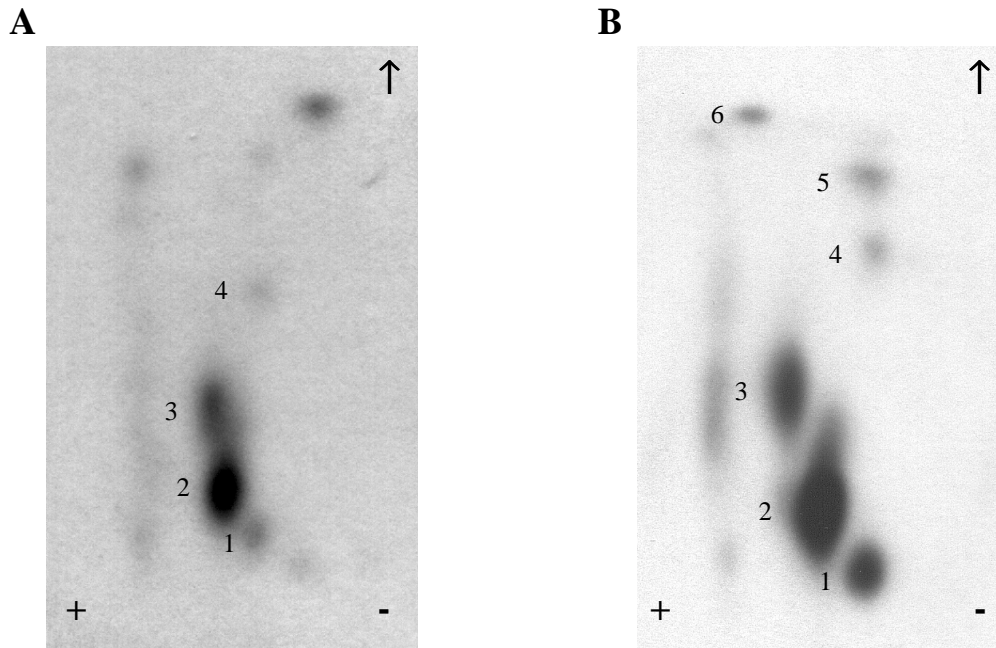
Phosphorylierte Fragmente von mit Ameisensäure gespaltenem Prp4p und His<sub>6</sub>-Prp1p. Die Proteinfragmente wurden in einem 12 %igem SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Detektion der phosphorylierten Fragmente erfolgte über Autoradiographie. Spur 1: 0,5 µg Prp4p; Spur 2: 0,5 µg Prp4p + 0,7 µg His<sub>6</sub>Prp1p.

Im Ansatz mit Prp4p sind zwei Banden im Größenbereich von 47 kDa und 60 kDa zu erkennen (Abb. 3.14, Spur 1). Die obere Bande ist auf ungespaltene Kinase zurückzuführen. Die untere Bande stammt von dem 47 kDa großen N-terminalen Peptid.

In dem Ansatz, in dem Prp4p mit His<sub>6</sub>-Prp1p inkubiert wurde, sind weitere Banden zu erkennen (Abb. 3.14, Spur 2). Die Bande bei 20 kDa ist der Größe nach auf das 19,1 kDa Peptid im N-terminalen Bereich von Prp1p zurückzuführen. Die Bande bei 30 kDa könnte von einem partiell gespaltenen Prp1p-Fragment vom N-Terminus des Proteins stammen, das neben dem 19 kD-Fragment auch das 7 kDa große sowie das aus fünf Aminosäuren bestehende Peptid enthält. Im Größenbereich von 70 kDa ist keine radioaktive Bande zu erkennen (Abb. 3.14, Spur 2). Offensichtlich wird der C-terminale Bereich von Prp1p, der die 19 TPR-Motive umfaßt, nicht phosphoryliert.

Mittels Massenspektrometrie konnte bestätigt werden, daß es sich bei der phosphorylierten Bande bei 20 kDa tatsächlich um das 19,1 kDa große Peptid vom Prp1p N-Terminus handelt [H. Urlaub, persönliche Information]. Um zu überprüfen, ob alle Phosphorylierungsstellen in Prp1p innerhalb dieses Fragmentes liegen, wurde ein Phosphopeptidmap angefertigt. Dazu wurde das Fragment mit Trypsin gespalten. Die Auftrennung der Peptide ergibt ein Muster,

das Ähnlichkeit mit dem Peptidmuster von His<sub>6</sub>-Prp1p hat (vgl Abb.3.15A und B).



**Abb. 3.15:**

Phosphopeptidmap (A) des 19,1 kDa großen Ameisensäurefragments von Prp1p. (B) von His<sub>6</sub>-Prp1p. Nach dem Verdau des Peptids bzw. Proteins mit Trypsin wurden die Peptide auf Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatte mittels Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt. Phosphorylierte Peptide wurden über Autoradiographie detektiert.

Die Spots 1 – 3 der drei stark phosphorylierten tryptischen Peptide, die in Phosphopeptidmaps von His<sub>6</sub>-Prp1p nachgewiesen werden können (Abb. 15B), treten auch im Phosphopeptidmap des 19,1 kDa großen Ameisensäurefragments von Prp1p auf (Abb. 3.15A). Diese Beobachtung spricht dafür, daß die drei Hauptphosphorylierungsstellen in Prp1p alle innerhalb dieses Fragments liegen. Es enthält 13 Threonine (Abb. 3.16). Die Mutation der Threonine 155 und 160 hatte bereits ergeben, daß diese beiden Aminosäuren nicht von Prp4p phosphoryliert werden (s. Abschnitt 3.5.4). Die Phosphorylierungsstellen müssen damit unter den verbleibenden 11 Threoninen gesucht werden. Sie werden zur Zeit mutiert, um die Phosphorylierungsstellen mit Hilfe von Phosphopeptidmaps identifizieren zu können. Diese Versuche werden auch zeigen, ob sich die Spots 4, 5 und 6 des Phosphopeptidmaps des Gesamtproteins auf zusätzliche Phosphorylierungsstellen zurückführen lassen und, wenn ja, ob auch diese in dem 19,1 kDa großen Fragment liegen.

AS  
 ↓  
 70 PDNEVALFA<sup>79</sup>TAPYDHEDEEADKIYQSVEEHL SKRRKSQREKQEQLQKEY 119  
  
 120 EKENPKVSSQFADLKRGLS<sup>139 141</sup>TLTDEDWNNIPEPGDL<sup>155 160</sup>TRKKRTKQPRRERFY 169  
  
 170 <sup>171</sup>A<sup>193 197 199</sup>TSDFVLASARNENQAISNFAVD<sup>205 207</sup>TQAG<sup>T</sup>E<sup>T</sup>PD MN<sup>G</sup>TK<sup>T</sup>NFVEIGAARDKV 219  
  
 220 LGIKLAQASSNL<sup>232 236</sup>TSPS<sup>T</sup>ID AS  
 ↓ 238

**Abb. 3.16:**

Aminosäuresequenz des 19,1 kDa großen Ameisensäurefragmentes aus Prp1p, in dem die Phosphorylierungsstellen liegen. Die Threonine innerhalb dieser Sequenz wurden hervorgehoben, die Zahlen geben ihre Position im Gesamtprotein an. Die Spaltstellen für Ameisensäure (AS) sind eingezeichnet.

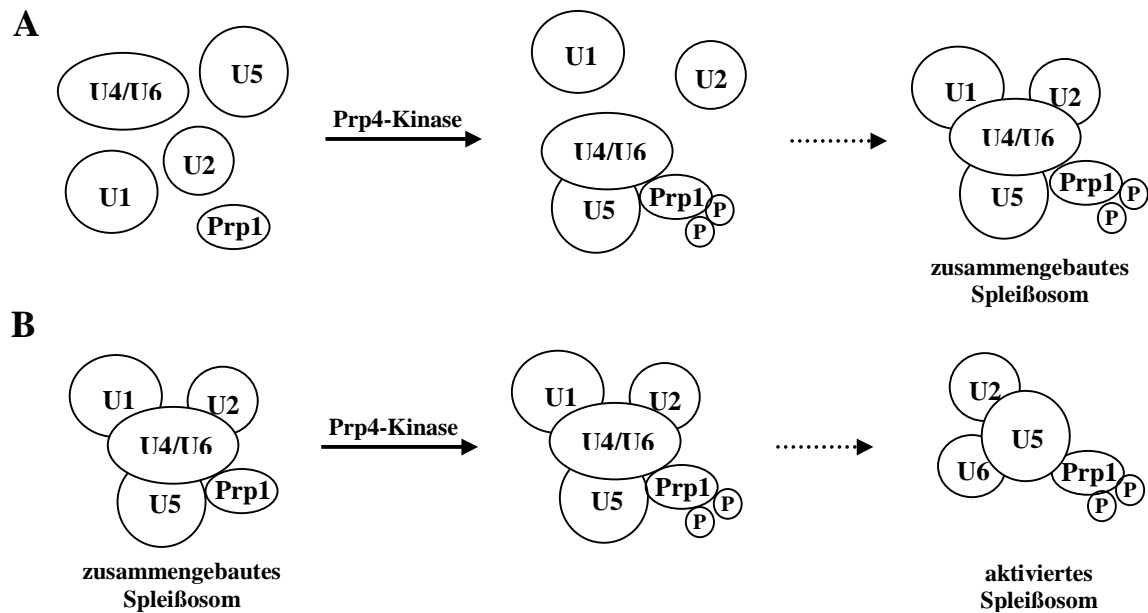
## 4 Diskussion

Bei Versuchen mit prä-mRNA-Spleißmutanten der Spaltheife *S. pombe* konnte die Prp4-Kinase identifiziert werden. Sie ist die erste Kinase, die mit dem Spleißen in Verbindung gebracht wurde. Um Hinweise auf Interaktionspartner zu erhalten, wurde nach Proteinen gesucht, die genetisch mit Prp4p interagieren. Eines dieser Proteine ist der Spleißfaktor Prp1p.

Die synthetische Letalität der temperatursensitiven Allele von *prp4* und *prp1* ist kein Beweis für eine direkte Interaktion der von ihnen kodierten Proteine. Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen weisen jedoch auf eine unmittelbare Interaktion von Prp4p und Prp1p hin. So konnte gezeigt werden, daß bakteriell produziertes Prp1p *in vitro* durch Prp4p phosphoryliert wird. Wird die Kinase durch eine Mutation in ihrem aktiven Zentrum inaktiviert, kann keine Phosphorylierung von Prp1p mehr nachgewiesen werden. Desweiteren wurde gezeigt, daß in Extrakten eines bei der permissiven Temperatur von 25 °C inkubierten *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes phosphoryliertes Prp1p nachweisbar ist. Wurde dieser Stamm bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inkubiert, war kein phosphoryliertes Prp1p mehr zu erkennen. Diese Daten sprechen dafür, daß Prp1p ein physiologisches Substrat der Prp4-Kinase ist [Schwelnus *et al.*, 2001]. Mittlerweile konnte für die beiden homologen Proteine im Menschen ebenfalls eine Interaktion *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf eine hohe Konservierung der Beziehung zwischen Prp4p und Prp1p ist [Dellaire *et al.*, 2002].

Es stellt sich die Frage nach der Bedeutung der Prp1p-Phosphorylierung durch Prp4p. Aus Extrakten von *S. cerevisiae*-Zellen präzipitiert das Prp1p-Homolog Prp6p zusammen mit den U4-, U5- und U6-snRNAs. In Zellen, die aufgrund einer Mutation in *prp6<sup>+</sup>* wenig Prp6p enthalten, sind kaum U4/U6.U5 tri-snRNPs nachweisbar, während freie U4/U6- und U5-snRNPs akkumulieren [Gallison und Legrain, 1993]. In Extrakten von HeLa-Zellen wurde das Prp1p-Homolog 102kD eng assoziiert mit dem U5-snRNP gefunden. *In vitro* translatiertes U5-102kD kopräzipitiert mit U4/U6-snRNPs. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vorgeschlagen, daß Prp1p im tri-snRNP als Bindeglied zwischen U5-snRNP und U4/U6-snRNP dient [Makarov *et al.*, 2000]. Es ist denkbar, daß die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p die Voraussetzung für den Zusammenbau des tri-snRNPs und damit für den Zusammenbau des kompletten Spleißosoms ist (Abb. 4.1A). Es ist aber auch möglich, daß Prp1p erst nach dem Zusammenbau des kompletten Spleißosoms von Prp4p phosphoryliert wird. Dadurch könnten die Rearrangements von snRNAs und prä-mRNA ausgelöst werden, die zur Ausbildung eines aktiven Zentrums im Spleißosom erforderlich sind (Abb. 4.1B).



**Abb. 4.1:**

Modelle für die Kontrolle des prä-mRNA-Spleißens durch die Prp4p-Kinase. **(A)** Die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p führt zum Zusammenbau des tri-snRNPs, was eine Voraussetzung für den Zusammenbau des gesamten Spleißosoms ist. **(B)** Die Phosphorylierung von Prp1p im zusammengebauten Spleißosom löst die für dessen Aktivierung erforderlichen Rearrangements aus.

Die genetischen Daten sprechen dafür, daß Modell B die Verhältnisse *in vivo* besser beschreibt: Mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems konnten Interaktionen von hPrp1p u. a. mit den Proteinen 90K, 116K (*S. pombe*: Cwf10), 200K (*S. pombe*: Spp41) und 220K (*S. pombe*: Spp42) nachgewiesen werden [R. Lührmann, persönliche Mitteilung]. Diese Proteine werden alle mit der im Rahmen der Aktivierung des Spleißosoms stattfindenden Enwindung der U4/U6 snRNAs in Verbindung gebracht [Nottrott *et al.*, 2002; Bartels *et al.*, 2002, Bartels *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2002]. Zwei dieser Prp1p-Interaktionspartner, Spp41p und Spp42p, wurden als Suppressoren von *prp4-73<sup>ts</sup>* identifiziert (s. Einleitung). Das ist ein Hinweis darauf, daß Prp1p und Prp4p direkt an der Aktivierung des Spleißosoms beteiligt sind.

Es wurde auch versucht, mit Hilfe biochemischer Experimente zwischen beiden Modellen zu unterscheiden. Dabei konnte nicht auf ein *in-vitro*-Spleißsystem für *S. pombe* zurückgegriffen werden. Bislang sind alle Versuche fehlgeschlagen, ein solches System für diese Hefe zu entwickeln. Vermutlich besteht das Problem darin, daß *S. pombe*-Extrakte im Gegensatz zu den Systemen von *S. cerevisiae* bzw. Metazoen kaum freies tri-snRNP enthalten. Dafür lassen sich in ihnen große Mengen eines U2·U5·U6-Partikels nachweisen, bei dem es sich wahrscheinlich um den in der Einleitung erwähnten postkatalytischen 40S-Komplex handelt [Huang *et al.*, 2002]. Beim Arbeiten mit *S. pombe* als Modellsystem ist man daher auf Untersuchungen der Verhältnisse *in vivo* angewiesen.

So wurde getestet, ob die Prp4p-Kinase einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Spleißkomplexe in *S. pombe*-Zellen hat. Zunächst wurde dazu das snRNA-Profil von Zellen eines bei 25 °C inkubierten *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes erstellt. In deren Extrakten ließen sich sowohl freie snRNPs als auch aus mehreren snRNPs zusammengesetzte spleißosomale Komplexe nachweisen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von [Huang *et al.*, 2002] waren nur geringe Mengen an tri-snRNPs detektierbar, dafür aber große Mengen des postkatalytischen 40S-Komplexes. Desweiteren konnte im Größenbereich von 55S ein Komplex nachgewiesen werden, der alle fünf snRNAs enthält. Dabei handelt es sich vermutlich um ein zusammengebautes Spleißosom vor dessen Aktivierung, ähnlich dem aus *S. cerevisiae* isolierten pentasnRNP [Stevens *et al.*, 2002]. Immunpräzipitationsversuche zeigten, daß das meiste Prp1p in diesem Komplex vorliegt.

Zum Vergleich wurde das snRNA-Profil von Zellen desselben Stammes erstellt, die bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inkubiert wurden. Der 55S große Komplex konnte auch in diesen Extrakten nachgewiesen werden. Verglichen mit den Extrakten der bei 25 °C inkubierten Zellen waren geringere Mengen des postkatalytischen 40S-Komplexes nachweisbar. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß bei der restriktiven Temperatur das Spleißen eingestellt wurde und keine neuen postkatalytischen Komplexe gebildet wurden. Die vor dem Shift auf 36 °C entstandenen 40 S-Komplexe wurden abgebaut, was dazu führte, daß in diesen Extrakten größere Mengen freier U2-, U5- und U4/U6-snRNPs nachgewiesen werden konnten [C. Bottner, persönliche Information]. Offensichtlich hat die Prp4-Kinase einen Einfluß auf die Zusammensetzung spleißosomaler Komplexe. Allerdings kann aufgrund dieser Ergebnisse keines der in Abb. 4.1 vorgestellten Modelle bestätigt oder widerlegt werden.

Letztendlich schließen sich die beiden Modelle auch nicht gegenseitig aus. Es ist denkbar, daß Prp1p zunächst phosphoryliert werden muß, damit das Spleißosom zusammengebaut werden kann. Nach dem Einbau des tri-snRNPs in das Spleißosom ist vielleicht eine erneute Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p erforderlich, um das Spleißosom zu aktivieren.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß es *in vitro* mindestens drei Phosphorylierungsstellen der Prp4p-Kinase in Prp1p gibt. Um untersuchen zu können, welche Folgen die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p hat, sollten diese identifiziert und durch gerichtete Mutagenese einzeln oder in Kombination gegen nichtphosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht werden. In einem konditional letalen *S. pombe*-Stamm, in dem die Expression des *prp1<sup>+</sup>*-Gens gezielt an- und ausgeschaltet werden kann, können die Auswirkungen der mutierten Phosphorylierungsstellen in Prp1p untersucht werden.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie war die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen der Prp4p-Kinase nicht möglich. Zum einen konnten in den Spektren nur 24 % bzw. 34 % der Prp1-Peptide nachgewiesen werden. Zum anderen wurde das in *E. coli* produzierte Prp1p bereits von bakteriellen Kinasen phosphoryliert, so daß auch in den Kontrollspektren phosphorylierte Peptide nachweisbar waren. Auch die Identifizierung mit Hilfe einer Prp1-Peptidbibliothek scheiterte. Neben der Aminosäuresequenz der Phosphorylierungsstelle ist auch deren Struktur für die Erkennung durch Proteinkinasen entscheidend [Kemp und Pearson, 1990]. Möglicherweise waren die Peptide der Bibliothek mit 15 Aminosäuren zu kurz, um die korrekte Struktur auszubilden. Für einige Kinasen konnte gezeigt werden, daß neben der Phosphorylierungsstelle weitere Bereiche im Substrat für ihre Spezifität erforderlich sind. Diese Bereiche werden als „docking sites“ bezeichnet. Über die docking sites kommt es zur Ausbildung eines Kinase/Substrat-Komplexes [Holland und Cooper, 1999]. Deshalb waren die Peptide möglicherweise zu kurz, um sowohl eine docking site als auch eine Phosphorylierungsstelle zu enthalten. Es ist denkbar, daß die Peptide, deren Spots erhöhte Radioaktivitätswerte aufwiesen, docking sites für Prp4p enthielten, über die eine Interaktion mit der autophosphorylierten Kinase erfolgte.

Hinweise auf die Lokalisation der Phosphorylierungsstellen in Prp1p erbrachte die Spaltung des Proteins mit Ameisensäure. Die drei Hauptphosphorylierungsstellen liegen alle innerhalb eines 19,1 kDa großen Fragments am N-Terminus von Prp1p, während der C-terminale Bereich, der die TPR-Motive umfasst, offensichtlich nicht phosphoryliert wird. Die Phosphoaminosäureanalyse hatte ergeben, daß Prp1p hauptsächlich an Threoninen phosphoryliert wird. Innerhalb des phosphorylierten Ameisensäurefragments liegen 13 Threonine, von denen zwei als Phosphorylierungsstellen ausgeschlossen werden konnten. Die verbleibenden 11 Threonine werden zur Zeit in Alanine mutiert. Phosphopeptidmaps der mutierten Proteine sollen dann Aufschluß darüber bringen, wo die Phosphorylierungsstellen liegen. Ein Phosphopeptidmap oder zumindest eine Phosphoaminosäureanalyse von *in vivo* phosphoryliertem Prp1p wären ebenfalls interessant, um festzustellen, ob *in vitro*- und *in vivo*-Phosphorylierungsstellen des Proteins identisch sind.

Einige Proteine spielen vermutlich sowohl beim Spleißen als auch bei der Zellzyklusregulation eine Rolle. So führen Mutationen in mehr als der Hälfte aller in *S. pombe* bekannten *prp*-Gene nicht nur zur Akkumulation von prä-mRNA, sondern auch zu einem Zellzyklusdefekt [Potashkin *et al.*, 1998]. Auch für Prp1p und Prp4p gibt es Hinweise auf eine Funktion im Zellzyklus. So ist *prp1*<sup>+</sup> identisch mit *zer1*<sup>+</sup>, einem Gen, das in einem Screen nach Zellzyklusregulatoren identifiziert wurde [Urushiyama *et al.*, 1997]. Desweiteren konnte

in der FACS-Analyse gezeigt werden, daß Stämme mit temperatursensitiven Allelen von *prp1* und *prp4* bei der restriktiven Temperatur in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus arretieren. Die Aktivität beider Proteine scheint für den Übergang von der G1- in die S-Phase sowie der G2-Phase in die Mitose essentiell zu sein. Es wurde gezeigt, daß die Prp1p-Konzentration über den Zellzyklus schwankt, wobei die Konzentration dieses Proteins in der G1- und in der G2-Phase am höchsten ist [C. Bottner, persönliche Mitteilung]. Damit ist denkbar, daß Prp1p der limitierende Faktor bei der Bildung von Spleißosomen ist und diese vor allem in der G1- und der G2-Phase des Zellzyklus zusammengebaut werden. Die Prp4p-Konzentration über den Zellzyklus ist konstant. Untersuchungen darüber, ob die Aktivität dieser Kinase zu allen Phasen des Zellzyklus gleich ist, wären interessant, um weitere Hinweise auf die Verknüpfung zwischen prä-mRNA-Spleißen und Zellzyklus zu erhalten.

Desweiteren sind zusätzliche Versuche erforderlich, um zu klären, ob Prp4p außer Prp1p auch andere Proteine phosphoryliert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die beiden in *S. pombe* identifizierten SR-Proteine Srp1p und Srp2p *in vitro* Substrate von Prp4p sind. Beide Proteine sind auch *in vitro* Substrate von Dsk1p, dem *S. pombe*-Homolog von SRPK1. Die Phosphorylierung durch Dsk1p findet an Serinen in der SR-Domäne statt [Tang *et al.*, 2000, Tang *et al.*, 2002], die Phosphorylierungsstellen der Prp4p-Kinase sind nicht bekannt.

Weitere potentielle Substrate von Prp4p sind die Spleißfaktoren, die genetisch mit der Kinase interagieren. Zur Zeit wird untersucht, ob der extragene Suppressor der *prp4-73<sup>ts</sup>* Mutation, Spp42p, von Prp4p phosphoryliert wird. SAP155, dessen *S. pombe* Homolog Prp10p genetisch mit Prp4p interagiert, ist das erste spleißosomale Protein ohne SR-Domäne, das in phosphorylierter Form nachgewiesen werden konnte. Die Phosphorylierung findet während oder direkt nach dem ersten katalytischen Schritt des Spleißens statt und ist vielleicht für die Regulation des Spleißens wichtig [Wang *et al.*, 1998]. Wahrscheinlich ist SAP155 das Substrat mehrerer Kinase, die bislang jedoch nicht identifiziert werden konnten [Boudrez *et al.*, 2002]. Möglicherweise ist Prp4p eine davon. Auch wenn die Konsensussequenzen der Phosphorylierungsstellen von Kinasen oft degeneriert sind und teilweise weitere Sequenzen für deren Erkennung entscheidend sind, ist es denkbar, daß die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen in Prp1p Hinweise auf Phosphorylierungsstellen in anderen Interaktionspartnern der Prp4p-Kinase liefert. Deren Identifizierung könnte damit entscheidend vereinfacht werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte

**Tab. 5.1:** Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer	BRL
Blockthermostat BT100	Kleinfeldt Labortechnik
Chromatographie-System BiologicLP	BIO-RAD
Elektrophoresesystem MultiphorII	Amersham Pharmacia Biotech
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall
Laborzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Rotoren: SS34, GS-3	Sorvall
Spektralphotometer DU-530	Beckmann
Taumelgerät Modell 3012	GFL
Thermocycler	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Tischkühlzentrifuge fresco	Heraeus
Vakuumkonzentrator SpeedVac plus SC11A	Savant
Wasserbad MultiTemp3	Amersham Pharmacia Biotech

### 5.2 Chemikalien

**Tab. 5.2:** Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
$\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP, 370 MBq/ml, 110 Tbq/mmol	Hartmann Analytic
Acetonitril	Roth
Acrylamid, Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
Agar	BRL
Agarose	Biomol
Ampicillin	Sigma
Ammoniumbicarbonat	Sigma
APS	Roth
Biotin	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA	Merck
n-Butanol	Roth
Calciumpantothenat	Merck

Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Biomol
Ethanol	Chemikalienlager TU BS
Glucose	Caelo
Glycerin	Roth
Hefe-Extrakt	BRL
HEPES	Roth
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Lambda-DNA (HindIII geschnitten)	BRL
Lithiumacetat	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Nicotinsäure	Roth
Ninhydrin	Sigma
Nucleobond Plasmid Midi Kit	Machery Nagel
Nitrocellulosemembran	Qiagen
o-PhosphoL-Serin	Sigma
o-PhosphoL-Threonin	Sigma
o-PhosphoL-Tyrosin	Sigma
PEG 4000	Roth
Pepton 140	BRL
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:48:2)	Roth
[ <sup>32</sup> P]-Phosphorsäure, 2000 MBq/ml	Hartmann Analytic
Polyvinylpyrrolidon	Merck
Pyridin	Sigma

Salzsäure (37 %)	Roth
TEMED	Roth
TPCK behandeltes Trypsin	Sigma
X-Gal	PeqLab

### 5.3 Medien

Folgende Medien wurden für die Kultivierung von *S. pombe* verwendet:

EMM	Edinburgh minimal medium; als festes und flüssiges Medium
EMMP	Edinburgh minimal medium, phosphate-free

Die Zusammensetzung der Medien ist in [Moreno *et al.*, 1991] angegeben. Für die Kultivierung auxotropher Stämme wurden nach Bedarf 150 mg/l Leucin oder 100 mg/l Uracil zugegeben.

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde LB-Medium (fest und flüssig) verwendet, dem zur Selektion von Plasmiden je nach Bedarf folgende Antibiotika zugefügt wurden: Ampicillin (40 mg/l), Kanamycin (25 mg/l), Chloramphenicol (30 mg/l) oder Tetracyclin (15 mg/ml). Für die Identifizierung rekombinanter Klone wurden dem Medium 100 µl IPTG (100 mM) und 50 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) zugegeben.

### 5.4 Stämme

#### 5.4.1 *S. pombe*-Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *S. pombe* Stämme sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet. Sie wurden der Stammsammlung des Instituts für Genetik der TU Braunschweig entnommen und sind von den von Leupold [Leupold, 1950] beschriebenen Kulturen abgeleitet. Der Paarungstyp (PT) der Stämme sowie die durch die Allelbezeichnungen gekennzeichneten Mutationen sind jeweils angegeben. Die vorangestellte Bezeichnung „int“ kennzeichnet die Integration von Vektoren in das Hefegenom.

**Tab. 5.3:** verwendete *S. pombe*-Stämme

Stamm	PT	Genotyp
SL67	$h^{+N}$	<i>leu1-32 ura4-294 prp4-73<sup>ts</sup></i>
89	$h^{-S}$	<i>leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup></i> Plasmid pRHA41 <i>prp4<sup>+</sup></i>
257	$h^{-S}$	<i>leu1-32 ura4-294 int pRIPHA42prp1<sup>+</sup> prp4-73<sup>ts</sup></i>

Für die Expression von HA-Prp4p-K189I wurde der Stamm SL67 mit dem Plasmid pRHA42*prp4mut45* transformiert.

### 5.4.2 *E. coli*-Stämme

Folgende Stämme wurden für die Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA bzw. als Wirt für den Bakteriophagen M13mp18 verwendet:

**Tab. 5.4:** verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>; E.coli B-Stamm)</i> , enthält den λ-Prophagen DE3, der das T7 RNA-Polymerasegen trägt
BJ5183	F/RecBC <sup>-</sup> <i>sbcB endoJ Gal<sup>-</sup> mel<sup>-</sup> str<sup>-</sup> thi<sup>-</sup> Bio<sup>-</sup> hsd</i> [Lasson und Lacroute, 1981]
DH5α <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> φ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF)ΔlacU196 <i>deoR recA1 end A1 hsdR17 (rK<sup>-</sup>mK<sup>+</sup>) supE44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1</i>
CJ236	<i>dut1 ung1 thi-1 relA1</i> [pCJ105(Cam <sup>R</sup> )]F <sup>-</sup> [cat=(pCJ105; M13sCam <sup>R</sup> )]
M15	Nal <sup>S</sup> Str <sup>S</sup> rif <sup>S</sup> <i>lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr</i>
XL1Blue	<i>hsdR17 (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup> lac F<sup>-</sup> [proAB+ laqI<sup>q</sup>lacZΔM15 Tn10(tet<sup>R</sup>)]</i>

## 5.5 Vektoren

### 5.5.1 pRHA42/pRIPHA 42

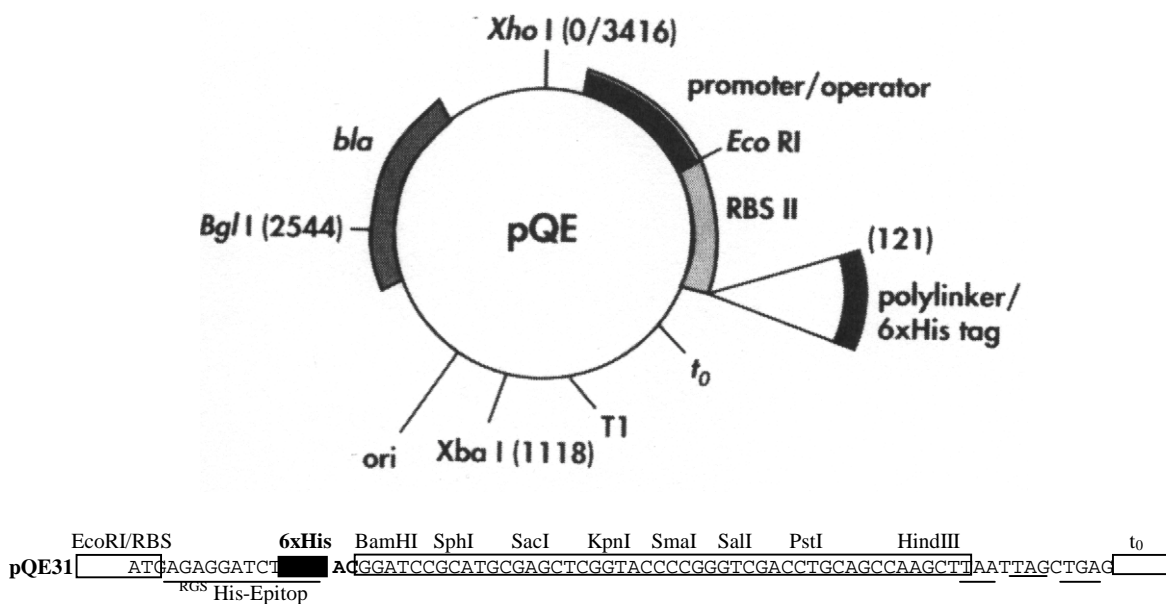
Die Vektoren pRHA42 bzw. pRIPHA42 basieren auf dem Plasmid pREP. pREP ist ein Shuttlevektor für *S. pombe*, der den *nmt1*-Promotor dieser Hefe besitzt und mit dem in den Polylinker klonierte cDNAs exprimiert werden können. Auch der Terminator, der sich an das klonierte Gen anschließt, stammt vom *nmt1*-Gen. Der *nmt1*-Promotor kann durch Zugabe von Thiamin zum Medium reprimiert werden [Maundrell, 1993]. pRHA42 und pRIPHA42 enthalten die „mittelstarke“ Version dieses Promotors, der durch eine Mutation in der TATA-Box eine geringere Transkriptionseffizienz aufweist, als die Wildtypform [Basi *et al.*, 1993]. Desweiteren sind pRHA42 und pRIPHA42 im Vergleich zu pREP um die Sequenz des Hemagglutinin-Epitops (HA-Epitops) erweitert, die 3x hintereinander vorkommt. Unmittelbar an diese zusätzlich Sequenz schließt sich der Polylinker an. Die exprimierten Proteine sind deshalb an ihrem N-Terminus mit einem dreifachen HA-Epitop versehen. Gegen dieses Epitop gibt es spezifische Antikörper, so daß bei der Detektion und Lokalisation der Fusionsproteine auf proteinspezifische Antikörper verzichtet werden kann [Craven *et al.*, 1998]. pRHA42 enthält das *ars1*-Element aus *S. pombe*, welches die Replikation dieses Plasmids in der Hefe ermöglicht. Durch Ausschneiden dieses Elements mit Hilfe von EcoRI entstand der Vektor pRIPHA42. Wird der pRIPHA42 durch ein Restriktionsenzym innerhalb des *ura4<sup>+</sup>*-Gens linearisiert, kann er durch homologe Rekombination in den *ura4*-Locus des *S. pombe* Genoms integriert werden [Bähler *et al.*, 1998]





### 5.5.3 Der QIAexpressionist™

Das QIAexpress-System der Firma QIAGEN ermöglicht die Fusion von Proteinen mit einer Domäne aus sechs Histidinresten, über die sie aufgereinigt werden können. Ein Plasmidsystem ermöglicht die regulierte Expression des Fusionsproteins. Es besteht zum einen aus dem pQE-Vektor, der eine hohe Expressionsrate des zu produzierende Proteins ermöglicht. Er besitzt einen starken, regulierbaren Promotor, der sich aus dem Promotor des Phagen T5 und zwei *lac*-Operator-Sequenzen zusammensetzt. Außerdem besitzt er den  $t_0$ -Transkriptionsterminator des Phagen  $\lambda$ . Dazwischen befindet sich eine synthetische Ribosomenbindungsstelle (RBSII), die für eine hohe Translationsrate sorgt, und eine für den His<sub>6</sub>-tag kodierende Sequenz. Um die Expression unterschiedlicher Leseraster zu ermöglichen, gibt es eine Serie von verschiedenen pQE-Vektoren. In jedem Leseraster befindet sich ein Stop-Codon zur Beendigung der Translation. Als Marker dient ein  $\beta$ -Lactamasegen, das Ampicillinresistenz vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor pQE31 verwendet (Abb. 5.3).



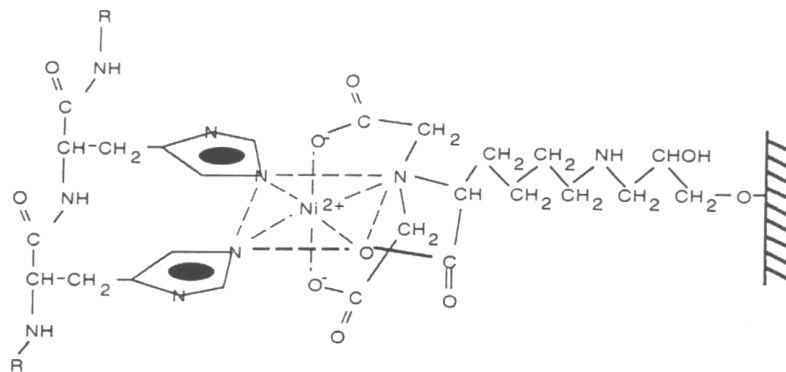
**Abb. 5.3:**

Karte eines pQE-Vektors und Sequenz des variablen Bereiches des Vektors pQE31. RBSII, synthetische Ribosomenbindungsstelle; *ori*, Replikationsursprung; *bla*,  $\beta$ -Lactamasegen.

Zum anderen besteht das Plasmidsystem aus dem Plasmid pREP4, das ein Gen für Kanamycinresistenz trägt und das durch das *lacI*-Gen kodierte lac-Repressorprotein konstitutiv expriert. Dieses kann in hohen Konzentrationen die Transkription des T5-Promotors des pQE-Plasmids effizient reprimieren. Die Expression des Fusionsproteins kann durch Zugabe von IPTG gestartet werden, das an den *lac*-Repressor bindet und diesen dadurch inaktiviert.

Die Aufreinigung der His<sub>6</sub>-Fusionsproteine erfolgt nach dem Prinzip der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC) über Nitrilo-tri-Essigsäure (NTA). Die NTA ist an eine

Matrix gebunden und mit Nickelionen beladen. Zwischen ihr und dem His<sub>6</sub>-tag bilden sich Komplexe aus (Abb. 5.4), die eine hohe Stabilität besitzen. Dadurch können verunreinigende Proteine unter sehr stringenten Bedingungen von der Matrix gewaschen werden, ohne die Bindung des Fusionsproteins zu beeinträchtigen. Dieses kann dadurch in nur einem Schritt von unter 1 % auf über 95 % aufgereinigt werden [Janknecht *et al.*, 1991]. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins kann entweder durch Senkung des pH-Wertes des Puffers auf pH 4,5 oder durch Erhöhung der Imidazol- bzw. Histidinkonzentration im Puffer erfolgen. Imidazol und Histidin haben eine ähnliche Struktur, so daß das Imidazol das Histidin von der Matrix verdrängen kann. Laut Hersteller hat die verwendete Ni-NTA-Agarose eine Bindungskapazität von 5 – 10 mg Fusionsprotein/ml Agarose.



**Abb. 5.4:**

Interaktionen zwischen dem His<sub>6</sub>-tag und der Ni-NTA-Agarose

#### Konstrukte für die Expression von Prp1p in *E. coli*:

Das *prp1*<sup>+</sup>-Gen wurde mittels PCR isoliert. Dazu wurden die Oligonucleotide K133 (5' ATATGTCGACCATGGCAAACCTTTTATCCAGAT 3') und K134 (5' ATATGTCGACTCAT AACACATTTATGGCAAGA 3') verwendet [Groß, persönliche Mitteilung]. Anschließend wurde es über Sall in den Polylinker des Vektors pQE31 kloniert.

Die cDNA für das Prp1p-Allel Prp1<sub>m</sub> (s. 3.5.4) wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme SphI und SmaI aus pUC18 ausgeschnitten und in den mit den entsprechenden Enzymen linearisierten Vektor pQE31 kloniert.

#### **5.5.4 Das Glutathion-S-Transferase Expressionssystem**

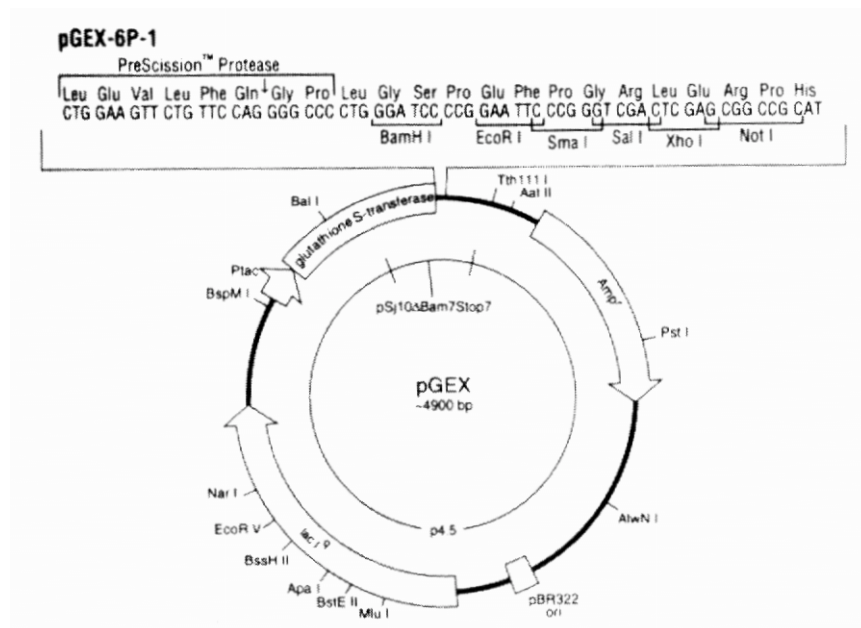
Das GST-Genfusionssystem der Firma Amersham Pharmacia Biotech ermöglicht die Fusion eines klonierten Gens mit der 26 kDa großen Glutathion S-Transferase-Domäne (GST-Domäne) aus *Schistosoma japonicum*. Über die GST-Domäne können die Fusionprotein mit Hilfe der Affinitätschromatographie mit Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt werden.

Ein Hauptbestandteil dieses Systems sind die pGEX-Vektoren (Abb. 5.5). Sie besitzen den durch IPTG-Zugabe induzierbaren *lac*-Promotor. Das *lacI*<sup>q</sup>-Gen für die Synthese des Repressors dieses Promotors liegt ebenfalls auf dem Plamid. Als Selektionsmarker dient ein Gen für

Ampicillinresistenz.

Die Vektoren der pGEX-Serie unterscheiden sich im Polylinker. Dieser enthält zusätzlich die Erkennungssequenzen und Schnittstellen von Proteasen. Mit Hilfe der Protease kann das Protein direkt von der Gluthation Sepharose eluiert werden, der GST-Rest verbleibt an der Matrix. Pro Liter Bakterienkultur lassen sich mit Hilfe dieses System zwischen 1 und 10 mg Protein aufreinigen.

Für die Expression der Prp4-Kinase in *E. coli* wurde der Vektor pGEX-6P-1 verwendet, in dessen BamHI-Schnittstelle *prp4*<sup>+</sup> kloniert worden war.



**Abb. 5.5:**

Karte eines pGEX-Vektors mit dem Polylinker des verwendeten pGEX-6P-1-Plasmids. Amp<sup>r</sup>, Ampicillinresistenzgen; pBR322 ori, Replikationsursprung; *lacI*<sup>q</sup>, Gen für den *lac*-Repressor.

## 5.6 Standard DNA-Methoden

### 5.6.1 Transformation von *E. coli*

*E. coli* Zellen wurden nach der Methode von [Brown *et al.*, 1975] transformiert. Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer stationären *E. coli*-Vorkultur angeimpft. Die 100 ml Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min bei 3500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung vorsichtig resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut für 10 min bei 3500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 9 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 450 µl Aliquots bei –80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden 200 µl kompetente Zellen mit der wässrigen DNA-Lösung gemischt und für 40 min auf Eis inkubiert. Für die anschließende Hitzeschockbehandlung wurden die Ansätze für 2 min

bei 42 °C in einem Wasserbad inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 5000 Upm wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **5.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

#### **Plasmid Mini-Präparation**

In der Regel wurde für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* die Methode nach [Gatermann *et al.*, 1988] angewendet. 2 ml LB-Medium wurden mit Zellen aus einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 110 µl STET-Puffer ( 8 % Saccharose (w/v), 5 % Triton X-100 (v/v), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 0,5 mg/ml Lysozym) erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Ansätze für 2 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Die Zelltrümmer wurden 15 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 110 µl Isopropanol. Die Ansätze wurden für 20 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde die abzentrifugierte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet und in 50 µl 1 x TE-Puffer gelöst.

#### **Midi-Präparation von Plasmid-DNA**

Bis zu 100 µg Plasmid-DNA lassen sich mit Hilfe des Nucleobond AX100 Kits der Firma Marchery & Nagel aus einer 50 - 100 ml *E. coli*-Kultur isolieren. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### **5.6.3 PCIA-Extraktion und Fällung von Plasmid-DNA**

Mittels einer PCIA-Extraktion kann DNA von Proteinen gereinigt werden. Zu einer wäßrigen DNA-Lösung wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 Volumen PCIA (Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 50:48:2) gegeben. Um die beiden Phasen gründlich zu vermischen, wurde gevortext. Durch eine Zentrifugation von 10 min bei 13000 Upm wurden die Phasen wieder voneinander getrennt. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform extrahiert. Erneut wurde für 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Um die DNA zu fällen, wurden 2,5 Volumen 96 % Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat zugegeben und der Ansatz für 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA durch

eine Zentrifugation von 13000 Upm und 20 min bei 4 °C pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O oder in 1 x TE-Puffer gelöst.

#### **5.6.4 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen**

Doppelsträngige DNA wurde mit Restriktionsendonucleasen der Firmen MBI Fermentas, Gibco BRL und New England BioLabs (NEB) gespalten. Pro µg Plasmid-DNA wurde mindestens 1 U Restriktionsenzym zugegeben. Durch Zusatz von 0,1 µl RNase A (10 mg/ml) pro 10 µl Ansatz wurde die RNA entfernt. Reaktionspuffer und -temperatur wurden nach Herstellerangaben ausgewählt und die Ansätze für 1 h inkubiert.

#### **5.6.5 Dephosphorylierung von DNA**

Die Rezirkularisierung des Vektors bei der Ligation sollte durch die Entfernung des 5'-Phosphatrestes der Vektor-DNA mittels alkalischer Phosphatase (CIAP) verhindert werden. Dazu wurden 1 µg des linearisierten Vektors mit 1 U CIAP für 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch eine PCIA-Extraktion inaktiviert und die DNA mittels einer Ethanolfällung präzipitiert.

#### **5.6.6 DNA-Ligation**

Vektor- und Insert-DNA wurden mit Hilfe der T4-Ligase der Firmen Gibco BRL und MBI Fermentas ligiert. Pro 20 µl Ligationsansatz wurden 0,1 - 0,2 µg Vektor-DNA eingesetzt. Die Insert-DNA wurde im fünffachen Überschuß zugegeben. Die Ligation erfolgte für mehrere Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14,8 °C in einem Wasserbad.

#### **5.6.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden diese in 0,7 - 1,2 %igen (w/v) Agarosegelen in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 100 V für 20 - 60 min aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden zum Auftragen mit 1/6 Volumen Ladepuffer (15 % (w/v) Ficoll 400; 0,25 % Bromphenolblau) versetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (89 mM Tris-Borat, pH 8,3; 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) verwendet. Mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnittene DNA des Bakteriophagen λ diente als Größenstandard. Die Fragmentgrößen dieses Markers betragen 21,2; 5,1; 5,0; 4,3; 3,5; 2,0; 1,9; 1,6; 1,4; 0,9; 0,8; 0,6 und 0,1 kb.

Durchgeführt wurde die Elektrophorese in der Horizon 58 Elektrophoresekammer der Firma Gibco BRL.

### Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits von QIAGEN aus Agarosegelen eluiert. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 5.6.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger entwickelten Methode des basenspezifischen Kettenabbruchs durch Didesoxynucleotide [Sanger *et. al.*, 1977] mit Hilfe des Cycle-Sequencing Kits der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems. Dieses Kit verwendet zur Endmarkierung der DNA-Fragmente 2'3'-Didesoxynucleotide mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, wodurch die Sequenzreaktion in einem Ansatz durchgeführt werden kann.

Für einen Sequenzansatz wurden etwa 0,5 µg DNA eingesetzt. Dazu wurden 2 µl Premix (dNTPs, DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub>, Puffer) und 1 µl Primer (5 pmol/µl) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und der Ansatz mit Bidest auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden in ein PCR-Gerät gestellt und folgendes Programm gestartet: 30 sec 96 °C (Denaturierung); 15 sec 46 °C (Primer-annealing); 4 min 60 °C (Elongation); 25 Zyklen, Abkühlung auf 4 °C. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl Bidest, 2 µl 3 M NaAC, pH5,2, 1,5 µl Dextranblau und 50 µl 100 % Ethanol gefällt. Die gefällte DNA wurde für 15 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und anschließend mit 125 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt und die Ansätze für 5 min in der SpeedVac getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 12,5 µl TSR-Puffer aufgenommen und für 2 min auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde sie in ein Sequenzependordgefäß überführt und bis zur Analyse der Sequenzreaktion bei 4 °C gelagert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe eines ABI Prism<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzers.

### 5.7 Gerichtete Mutagenese von *prp1*

Die gerichtete Mutagenese der *prp1*-cDNA wurden mit Hilfe des MutaGene M13 *in vitro* Mutagenese Kits 2 der Firma Biorad durchgeführt. Dieses Kit basiert auf dem Verfahren von [Kunkel *et al.*, 1987] und ermöglicht die gezielte Mutagenese einer DNA-Sequenz mit Hilfe des Bakteriophagen M13. Die Mutagenese wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Für die Mutagenese wurde die *prp1*-cDNA in die SalI-Schnittstelle des Vektors M13mp18 kloniert. Nach der Ligation lag das offene Leseraster der *prp1*-cDNA in der Orientierung von HindIII (TAA) nach EcoRI (ATG) vor. Daher wurden die Oligonucleotide für die Mutagenese vom kodierenden Strang der cDNA-Sequenz abgeleitet. Damit sich die Mutationen leichter nachweisen lassen, wurde bei der Auswahl der Oligonucleotide darauf geachtet, daß durch die Mutagenese neue Restriktionschnittstellen in der *prp1*-cDNA entstehen. Die Sequenzen der Oligonucleotide sind in der Tabelle 5.5

angegeben, ebenso die neuen Restriktionsschnittstellen, die durch die Mutagenese entstehen.

**Tab. 5.5:** Oligonucleotide für die Mutagenese der *prp1*-cDNA

Oligo	Sequenz	neue Schnittstelle
Prp1(T155A/T160A)	5'-GAACCCGGCGATCTCGCGAGGAAAAACGCGC TAAACAGCCGAGACG-3'	NruI
Prp1(T343A)	5'-CGTTAAAAAATTACCAAAGTCAGTGGCGTTA TGGCTCGAGGCCGAAAAACTTGAAAATCAAGC-3'	XhoI
Prp1(T415A)	5'-GCTCTTGCTCAGCTTGAAGCATATGAGAATGCT AAAAAGGTGC-3'	NdeI
Prp1(T797A/T800A)	5'-CGCGCACAGCGTAAAGCTCGAGCTGCAGATGC TTTAAGG-3'	XhoI, PstI
Prp1(T885A/T894A)	5'-GGCCCAGTATCGCGAAAGATATCAAAAATTCT CGGAAGGCGCCGCGAGGAAGTATTAC-3'	NruI, EheI

Die Oligonucleotide wurden einzeln oder, um Doppelmutationen zu erzeugen, in Kombination eingesetzt. M13mp18-Konstrukte mit erfolgreich gesetzten Mutationen in der *prp1*-cDNA wurden als Template für weitere Mutageneserunden verwendet. Die mutierten cDNAs wurden sequenziert und anschließend über die Restriktionsenzyme SphI und XbaI in den Vektor pUC18 (s. 5.5.2) kloniert.

## 5.8 Standard Protein-Methoden

### 5.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, 1976] basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G 250 von  $\lambda = 465$  zu  $\lambda = 595$ , sobald dieser mit Proteinen Komplexe ausbildet. Der Absorptionsanstieg bei  $\lambda = 595$  wird photometrisch ermittelt und durch Vergleich mit den Werten einer Kalibrierkurve lässt sich daraus die Proteinkonzentration bestimmen. Für die Erstellung der Kalibrierkurve wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml) in dem Puffer angesetzt, in dem auch die zu vermessende Probe vorlag. Von der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA-Konzentrationen zwischen 2 und 15  $\mu\text{g/ml}$  hergestellt. Je 2  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnungen wurden mit je 1 ml frisch 1 : 5 verdünntem und filtriertem Bradfords-Reagenz (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250; 50 ml Ethanol (95 %); 100 ml konzentrierte  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; 50 ml Bidest) gemischt und 5 – 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Standardproben im Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  vermessen. Die zu bestimmenden Proben wurde auf die gleiche Weise mit Bradfords-Reagenz vermischt und die Konzentration im Photometer bestimmt.



### 5.8.2 Umpuffern und Konzentrieren von Proteinlösungen mittels Ultrafiltration

Proteinlösungen wurden mit „Vivaspin 0,5 ml Concentrator, 10000 MWCO“ Ultrafiltrationssäulen der Firma Sartorius umpuffert und konzentriert.

### 5.8.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen SDS-Gel [Laemmli, 1970]. Dieses bestand aus einem 4 %igem Sammelgel (3,03 ml Bidest; 1,25 ml 4x Sammelgelpuffer [0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS]; 0,65 ml Acrylamidstammlösung, 30 %; 5 µl TEMED; 50 µl APS, 10 % w/v) und einem 7,5 oder 12 %igem Trenngel. (Bsp. 7,5 %iges Trenngel: 12,23 ml Bidest, 6,25 ml Trenngelpuffer [1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS]; 6,25 ml Acrylamidstammlösung, 30 %; 20 µl TEMED; 250 µl APS, 10 % w/v). Die Proteinlösung wurde mit 2 x-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 4 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 20 % (v/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und auf das Sammelgel aufgetragen. In diesem wurden sie bei 100 V konzentriert. Anschließend erfolgte die Auftrennung im Trenngel bei 150 V. Als Laufpuffer wurde Glycinpuffer verwendet (25 mM Tris; 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS), als Marker wurde der Prestained Protein Marker Broad Range der Firma Biolabs eingesetzt.

### 5.8.4 Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)

Als Western-Blot wird die Übertragung von Proteinen auf Membranen bezeichnet. Hierzu wurden die Proteine mit einem Elektrobloßgerät der Firma PHASE GmbH auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Aufbau des Blots erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Proteintransfer fand bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Membran für 90 min statt. Die Membran mit den geblotteten Proteinen kann eingeschweißt in Folie bis zu 3 Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 5.8.5 Immunodetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Mit Hilfe spezifischer Antikörper erfolgte der Nachweis auf der Membran fixierter Proteine. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 1 h in Blockpuffer (10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer (137 mM NaCl; 27 mM KCl; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0); 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>) inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der 1: 1000 in TBS verdünnt worden war, für 1 h. Die Membran wurde erneut 2 x mit TBS gewaschen und anschließend für 1 h mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten, Antikörper inkubiert. Dieser wurde 1: 1500 in TBS verdünnt (bei Verwendung des anti-His-Antikörpers als primären Antikörpers wurde der zweite Antikörper in TBS + 1 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt). Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS gewaschen und 2 x 20 min in TBS-Tween (0,05 %) inkubiert. Die Nachweisreaktionen erfolgten mit Hilfe des „ECL detection systems“ der Firma AMERSHAM LIFE SCIENCE. Das dabei verwendete Entwicklungsreagenz enthält Luminol. Dieses

wird von der an den sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert, wobei Licht emittiert wird. Dieses Licht wurde durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films detektiert.

#### 5.8.6 Isolierung von Proteinextrakten aus *S. pombe*

Die Isolierung von Gesamt-Proteinen aus *S. pombe* wurde in Anlehnung an das Protokoll von [Moreno *et al.*, 1991] durchgeführt: aus 50 ml Kultur wurden die Zellen bei einer  $\text{OD}_{600} = 0,8 - 1,0$  durch eine Zentrifugation von 5 min bei 3000 Upm geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml Stop-Puffer (150 mM NaCl; 50 mM NaF; 10 mM EGTA; 1 mM  $\text{NaN}_3$ ; pH 8,0 mit NaOH) gewaschen und in ein Pyrex-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 5 min bei 3000 Upm pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 0,4 ml HB-Puffer (25 mM MOPS, pH 7,2 mit NaOH; 15 mM EGTA; 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 60 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 1 mM DTT; 0,1 mM  $\text{NaVO}_3$ ) mit Proteaseinhibitoren (12,5 mg/ml) aufgenommen. Bis zum Meniskus des Puffers wurden Glasperlen zu dem Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde abwechselnd für 20 sec gevortext und für 40 sec auf Eis gekühlt, insgesamt wurde für 5 min gevortext. Die Glasperlen wurden 2x mit je 800  $\mu\text{l}$  HB-Puffer gewaschen und die Überstände in ein 2 ml Reaktions-gefäß überführt. Es folgte eine 15 minütige Zentrifugation der Überstände bei 13000 Upm und 4 °C. Der Überstand wurde in 400  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 5.8.7 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von Proteinen wurden 400 Proteinextrakt mit 1  $\mu\text{l}$  Antikörper versetzt und 2 h bei 4 °C auf dem Rollenmischer inkubiert. Der Ansatz wurde für 10 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 25  $\mu\text{l}$  PAS-Suspension (0,1 g ProteinA-Sepharose (PAS) für 1 h bei RT in 1 ml HB-Puffer quellen, 5 min bei 13000 Upm zentrifugierten, den Überstand entfernen und die aufgequollene PAS 2 x mit jeweils 1 ml HB-Puffer waschen. PAS in 600  $\mu\text{l}$  HB Puffer mit 0,02 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  aufnehmen und bei 4 °C lagern.) versetzt. Nach einer Inkubation von 2 h bei 4 °C auf dem Rollenmischer wurde der Ansatz für 1 min bei 4 °C und 7000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur Kontrolle aufgehoben. Die Präzipitate wurden je einmal mit 0,4 M HCl und mit 1,0 M HCl sowie 2 x mit Kinasepuffer (s. 5.10) gewaschen und in 20  $\mu\text{l}$  Kinasepuffer aufgenommen. Anschließend wurden sie in 10  $\mu\text{l}$  Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 5.8.8 Acetonfällung

Für eine Acetonfällung wurden gleiche Volumina Proteinlösung und Phenol/Chloroform gut gemischt (Vortex). Der Ansatz wurde für 5 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die wäßrige Phase

wurde verworfen und zu der organischen Phase und der Interphase wurde das 5,5 fache Volumen Aceton zugegeben. Dieser Ansatz wurde für mindestens 2 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor das gefällte Protein durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$  abgetrennt wurde. Das Proteinpellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 2 min in der SpeedVac getrocknet.

## 5.9 Aufreinigung in *E. coli* exprimierter Proteine

### 5.9.1 Expression und Aufreinigung von Prp4p

Für die Expression von GST-Prp4p wurde eine Vorkultur von DH5 $\alpha$  + pGEX-6p-1prp4 in LB + Amp über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Von dieser wurden am nächsten Morgen 10 ml in 490 ml LB + Amp verdünnt und für 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Expression von GST-Prp4p wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  1 M IPTG induziert und der Ansatz für weitere 3 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 5000 Upm geerntet und 1 x mit 1 x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4) gewaschen. Falls die Proteinaufreinigung später erfolgte, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ansonsten wurden sie in 1,5 ml Lysis-Puffer (TBS + 12,5 mg/ml Proteaseinhibitoren + 1 mg/ml Lysozym + 5  $\mu\text{l}$ /ml RNase-Stammlösung (10 mg/ml) und 5  $\mu\text{l}$ /ml DNase-Stammlösung (10 mg/ml)) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß durch 5 je 10 sec dauernde Ultraschallstöße von 100 W, dazwischen wurden die Proben jeweils 30 sec auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$  abgetrennt. Der geklärte Proteinextrakt wurde mit 600  $\mu\text{l}$  Glutathion-Sepharose versetzt und für 45 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Rollenmischer inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Sepharose wurde 3 x mit je 1 ml PBS + 1 % (v/v) Triton + 1 % (v/v) DTT und 3 x mit je 1 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml Cleavage-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT). Die Sepharose wurde in 600  $\mu\text{l}$  Cleavage-Puffer aufgenommen und die gebundene Prp4p-Kinase wurde durch Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  PreScission<sup>TM</sup>-Protease und 4 h Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Rollenmischer von der Sepharose abgelöst. Die abgelöste Prp4p-Kinase wurde mittels Ultrafiltration in Kinasepuffer (s. 5.10) umgepuffert und gleichzeitig um den Faktor 3 konzentriert. Das umgepufferte, konzentrierte Protein wurde in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 5.9.2 Expression und Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Prp1p

Für die Expression von His<sub>6</sub>-Prp1p in *E. coli* wurde das Plasmid pQE31prp1 in den Stamm M15[pREP4] transformiert. Von diesem Stamm wurde eine Vorkultur in LB + Amp + Kan angesetzt und üN bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml der Vorkultur 1:10 in LB + Amp + Kan

verdünnt und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}=0,5$  weiterinkubiert. Die Kultur wurde auf 17 °C abgekühlt, bevor die His<sub>6</sub>-Prp1p-Produktion durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG gestartet wurde. Anschließend wurde die Kultur bei 17 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden durch 20 min Zentrifugation bei 6000 Upm und 4 °C geerntet und 1 x mit Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol), dem 12,5 mg/ml Proteaseinhibitoren, 1 mg/ml Lysozym, 10 µl/ml RNase-Stammlösung (10 mg/ml) und 5 µl/ml DNase-Stammlösung (10 mg/ml) zugefügt worden waren, aufgenommen. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen durch 5 Ultraschallstöße von je 10 sec und 100 W aufgeschlossen wurden, wobei sie zwischendurch für je 30 sec auf Eis gekühlt wurden. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation von 20 min bei 4 °C und 13000 Upm abgetrennt und der geklärte Überstand mit 2 ml NiNTA-Agarose versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4 °C auf dem Rollenmischer inkubiert, bevor die NiNTA-Agarose in eine Säule gefüllt wurde. Über diese wurden je 30 ml Lysispuffer und Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gepumpt. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit 4 ml Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) von der NiNTA-Agarose abgelöst. Vermutlich aufgrund der zahlreichen TPR-Motive am C-Terminus von Prp1p, die zur Ausbildung von Protein/Protein-Interaktionen führen, war es nicht möglich, das Protein nach der Ultrafiltration zurückzugewinnen. Deshalb wurden andere Methoden für das Umpuffern und Konzentrieren des aufgereinigten His<sub>6</sub>-Prp1p gewählt:

#### **Umpuffern von His<sub>6</sub>-Prp1p mittels Dialyse**

Mittels Dialyse können Proteinlösungen entsalzt und umgepuffert werden. Das His<sub>6</sub>-Prp1p-Eluat wurde dazu in einen Dialyseschlauch gegeben, der zuvor in einer 1 mM EDTA-Lösung aufgeköcht worden war. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde in 300 ml 5 mM HEPES, pH 7,4 mit KOH gegeben. Die Flüssigkeit wurde bei 4 °C gerührt und nach 1 h ausgetauscht. Die Gesamtzeit der Dialyse betrug 3 h.

#### **Konzentrieren von His<sub>6</sub>-Prp1p mittels Polyethylenglycol (PEG)**

Der Dialyseschlauch mit dem umgepufferten His<sub>6</sub>-Prp1p wurde mit pulverisiertem PEG4000 bedeckt und bei 4 °C so lange gelagert, bis so viel Flüssigkeit von dem PEG absorbiert worden war, daß das Volumen der Proteinlösung auf ca. die Hälfte des Ausgangsvolumens zurückgegangen war. Es war nicht möglich, His<sub>6</sub>-Prp1p-Konzentrationen über 0,2 mg/ml zu erhalten, ohne daß das Protein aus der Lösung ausfiel.

### **5.9.3 Expression und Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Srp1p und His<sub>6</sub>-Srp2p**

Die cDNAs von *srp1* und *srp2* lagen in den Vektor pET28a bzw. pET28b der Firma Novagen kloniert vor. Diese Vektoren wurden in den Stamm BL21(DE3) transformiert. In LB + Kan wurden Vorkulturen von BL21(DE3) + pET28a*srp1* bzw. BL21(DE3) + pET28b*srp2* angeimpft und über Nacht bei

30 °C inkubiert. Jeweils 25 ml dieser Vorkulturen wurden am nächsten Tag 1 : 10 in LB + Kan verdünnt und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Zugabe von je 250 µl 1 M IPTG zur Induktion der Proteinexpression wurden die Kulturen für weitere 3 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Pellets in jeweils 1,5 ml Lysispuffer (s. 5.9.2) aufgenommen. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch 5 Ultraschallstöße von 10 sec und 100 W aufgeschlossen (zwischen den einzelnen Ultraschallstößen wurden die Proben für jeweils 30 sec auf Eis gekühlt). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch eine Zentrifugation von 10 min bei 13000 Upm und 4 °C abgetrennt. Die geklärten Überstände wurden mit jeweils 400 µl NiNTA-Agarose versetzt und 30 min bei 4 °C auf dem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die NiNTA-Agarose abzentrifugiert (1 min, 13000 Upm, 4 °C) und 3 x mit jeweils 1 ml Lysispuffer sowie 3 x mit jeweils 1 ml Waschpuffer (s. 5.9.2) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit jeweils 500 µl Elutionspuffer (s. 5.9.2) von der NiNTA-Agarose abgelöst und anschließend in Kinasepuffer (s. 5.10) umpuffert. Auf diese Weise konnten aus 1 Liter Kultur etwa 0,35 mg His<sub>6</sub>-Srp1p bzw. 0,7 mg His<sub>6</sub>-Srp1p gewonnen werden.

### 5.10 Kinaseassays

Die Kinaseassays wurden in 20 µl Ansätzen durchgeführt. Diese enthielten Kinasepuffer (10 x Kinasepuffer: 200 mM HEPES, pH 7,4 mit KOH; 30 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 % (v/v) Glycerin; 5 mM DTT), 5 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 100 µM ATP und 2 µl HA-Prp4p-Immunpräzipitat und Substrat bzw. bakteriell exprimierte Prp4p-Kinase und Substrat. Die Ansätze wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 2 x Probenpuffer (s. 5.8.3) und 2 min Kochen im Wasserbad gestopt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE. Diese wurde abgebrochen, wenn sich die Bromphenolbande ca. 5 cm über der unteren Gelfront befand, damit die freien, radioaktiven Nucleotide nicht in den Puffer gelangten. Der untere Teil des Gels wurde mit der Bromphenolbande abgetrennt und der übrige Teil des Trenngels geblottet. Die Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie.

### 5.11 FACS-Analyse

Die Durchführung der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) von *S. pombe*-Kulturen erfolgte mit Hilfe des FACS-Calibur Geräts der Firma Becton-Dickinson. Für die Messung wurde die Zellzahl der Proben durch Auszählen mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt und auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Proben wurden für 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml eiskaltem Bideest aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 2500 Upm wurden die Zellen in 300 µl eiskaltem Bideest aufgenommen, mit 700 µl 70 % EtOH vermischt und bei -80 °C eingefroren. Die Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propi-

diumiodid erfolgte durch Waschen mit 1 ml 0,05 M Natriumcitrat-Lösung, pH7 – 8. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 2500 Upm wurden die Zellen in 500 µl 0,05 M Natriumcitrat-Lösung, pH7 – 8, der 1 mg/ml RNaseA zugefügt worden war, aufgenommen. Die Zelllösung wurde in ein licht-undurchlässiges 1 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Abbau der RNA für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 450 µl 0,05 M Natriumcitrat-Lösung und 50 µl 0,05 M Natriumcitrat-Lösung mit 200 µg/ml Propidiumiodid zu den Proben gegeben. Die Zellen wurden in dieser Lösung über Nacht bei 4 °C gefärbt. Am folgenden Tag erfolgten die FACS-Messungen.

### 5.12 *In vivo* Markierung von Prp1p

Die radioaktive Markierung von Prp1p erfolgte nach dem Protokoll von (Moreno *et al.*, 1991): Eine *S. pombe*-Vorkultur wurden in EMM angeimpft und 8 h inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit EMMP gewaschen und zum Animpfen einer 100 ml Hauptkultur in EMMP auf eine optische Dichte von  $OD_{600} \approx 0,05$  verwendet. Die Phosphatkonzentration wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge einer 0,5 M  $NaH_2PO_4$ -Lösung auf 1 mM eingestellt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bis zum Erreichen einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml ( $OD_{600} \approx 0,5$ ). Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden diese mit EMMP gewaschen und in EMMP mit einer Phosphatkonzentration von 100 µM aufgenommen. Die Zellzahl wurde dabei auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt ( $OD_{600} \approx 0,25$ ). Von dieser Kultur wurden 4 ml abgenommen und mit 0,5 mCi [ $^{32}P$ ]ortho-Phosphorsäure versetzt. Nach 4 h Inkubation wurden 13 ml einer wachsenden Kultur ( $OD_{600} \approx 0,5$ ) des selben *S. pombe*-Stammes hinzugegeben. Die Zellen wurden geerntet und Zellextrakte angefertigt.

### 5.13 Methoden zur Untersuchung phosphorylierter Proteine

#### 5.13.1 Phosphoaminosäureanalyse

Für die Durchführung einer Phosphoaminosäureanalyse muß das zu untersuchende Protein in seine Aminosäuren zerlegt werden. Dazu wird es in konzentrierter Säure oder Base inkubiert, was zur Hydrolyse der Peptid-Bindungen führt. Die Analyse wurde nach den Protokollen von [van der Geer *et al.*, 1993; Jelinek und Weber, 1993] durchgeführt. Dazu wurde die Bande des zu untersuchenden phosphorylierten Proteins aus dem Blot ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Nitrocellulosefragment wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 0,5 % Polivinylpyrrolidon in 100 mM Essigsäure überschichtet und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Membran 5 x mit je 1 ml Bidest und 2 x mit je 1 ml frisch hergestellter 50 mM  $NH_4HCO_3$ -Lösung gewaschen. Anschließend wurde das Fragment mit 150 µl der frisch hergestellten 50 mM  $NH_4HCO_3$ -Lösung überschichtet, der 15 µl Trypsin-Stammlösung (1mg/ml) zugefügt wurden. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden weitere 15 µl Trypsin-Stammlösung zugegeben und erneut für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 300 µl Bidest zugefügt und es folgte eine

Zentrifugation von 5 min bei 13000 Upm. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in der Speedvac bei 4 °C getrocknet. Auf die getrockneten Peptide wurden 50 µl 6 N HCl gegeben und der Ansatz für 1 h bei 110 °C inkubiert. Anschließend wurde er in der Speedvac getrocknet. Die Aminosäuren wurden 1 x mit 100 µl Bidest gewaschen und erneut getrocknet.

Es wurde eine 1 : 4-Verdünnung des Phosphoaminosäurestandards (1 mg/ml Phosphoserin, 1 mg/ml Phosphothreonin, 1 mg/ml Phosphotyrosin) in pH 2,5-Puffer (5,9 % (v/v) Eisessig; 0,8 % (v/v) Ameisensäure; 0,3 % (v/v) Pyridin) hergestellt. Von dieser Verdünnung wurden 4 µl auf den Ansatz mit den getrockneten Aminosäuren gegeben. Die gelösten Peptide wurden auf eine Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Um eine möglichst gute Auftrennung zu erzielen, wurde der Ansatz in 0,5 µl Aliquots aufgetragen und der Auftragspunkt vor dem Auftrag des nächsten Aliquots gut getrocknet. Die Dünnschichtchromatographieplatte wurde mit pH 2,5-Puffer angefeuchtet. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte für 45 – 60 min bei 20 mA und 16 °C.

Anschließend wurde die Platte getrocknet und mit Ninhydrinlösung (0,25 % (w/v) Ninhydrin in Aceton) besprüht. Bis zum sichtbar werden des Phosphoaminosäurestandards wurde sie bei 65 °C inkubiert. Danach wurden die phosphorylierten Phosphoaminosäuren mittels Autoradiographie detektiert.

### 5.13.2 Phosphopeptidmap

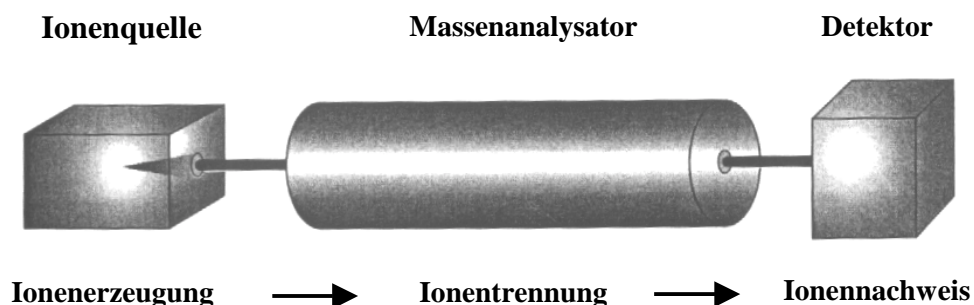
Mit Hilfe eines Phosphopeptidmaps läßt sich die Anzahl phosphorylierter Peptide eines Proteins abschätzen. Die Analyse wurde nach dem Protokoll von [van der Geer *et al.*, 1993] durchgeführt. Bis zum Trockenschritt nach der Spaltung mit Trypsin ist das Protokoll identisch mit dem für die Phosphoaminosäureanalyse (s. 2.13.1). Nach dem Trocknen wurden die Peptide durch Zugabe von 50 µl Perameisensäure (9 Teile Ameisensäure (95 – 100 %) mit 1 Teil 30 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung mischen, 1 h bei RT inkubieren) und 1stündiger Inkubation auf Eis oxidiert. Dadurch sollte das Auftreten von Oxidationsisomeren während der chromatographischen Auftrennung verhindert werden. Anschließend wurden 400 µl Bidest zu der Probe gegeben und diese wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurde sie in der Speedvac lyophilisiert. Die getrockneten Peptide wurden erneut in 300 µl Bidest gelöst und anschließend lyophilisiert. Danach wurden sie in 7,5 µl pH 1,9-Puffer (50 ml Ameisensäure (88%); 156 ml Eisessig; 1794 ml Bidest) aufgenommen und in 0,5 µl-Aliquots auf eine Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Zwischen dem Auftrag der einzelnen Aliquots sollte die auf den Auftragspunkt gegebene Flüssigkeit vollständig trocknen. Die Dünnschichtcelluloseplatte wurde mit pH1,9-Puffer angefeuchtet. Die Auftrennung der Peptide erfolgt bei 1 kV für ca. 40 min. Die Platte der Elektrophoreseapparatur wurde während des Laufs auf 16 °C gekühlt. Nachdem die Dünnschichtcelluloseplatte gut getrocknet war, wurde sie um 90° gedreht und in einen Chromatographietank mit Phosphochromatographiepuffer (750 ml n-Butanol; 500 ml Pyridin; 150 ml Eisessig; 600 ml Bidest) gestellt. Die Chromatographie wurde abgebrochen, wenn die Lauffront ca. 2 cm unterhalb der oberen Kante der Dünnschichtcelluloseplatte angekommen war.

Nachdem der Chromatographiepuffer verdampft war, wurden die phosphorylierten Peptide mittels Autoradiographie detektiert.

### 5.13.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Der Aufbau eines Massenspektrometers ist in Abb. 5.6 dargestellt: In der Ionenquelle wird die zu messende Substanz ionisiert. In der Analytik von Biomolekülen wird häufig die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisation (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) als Ionisierungsmethode angewendet: die Analytprobe wird mit einer sogenannten Matrix kokristallisiert, welche in der Regel aus kleinen organischen Molekülen besteht. Die kristalline Oberfläche der präparierten Probe wird einem kurzen Impuls von Laserstrahlen ausgesetzt, wodurch sowohl Matrix- als auch Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt werden. Im Massenanalysator werden diese Ionen dann bezüglich ihres Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) aufgetrennt.

Für die MALDI werden Flugzeitmassenspektrometer als Massenanalysatoren eingesetzt, welche auch als TOF (time of flight)-Analysatoren bezeichnet werden. Die Massenbestimmung der Ionen erfolgt hier über die Messung der Zeit, die zwischen ihrem Start in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Sie werden mit Hilfe eines Detektors nachgewiesen. Dieser liefert ein Massenspektrum, aus dem abgelesen werden kann, welche Ionen gebildet worden sind.



**Abb. 5.6:**

Komponenten eines Massenspektrometers [aus Lottspeich, 1998]

Bei der MALDI-MS bestehen die Spektren hauptsächlich aus einfach geladenen, intakten Peptidionen  $[M+H]^+$ . Erst bei der Analyse größerer Moleküle wie z. B. ganzer Proteine werden Peaks beobachtet, die auf das einfach geladenen Dimer  $[2M+H]^+$  bzw. mehrfach geladene Monomere wie  $[M+2H]^{2+}$  und  $[M+3H]^{3+}$  zurückzuführen sind [Lottspeich, 1998].

Um eine Verunreinigung der Ansätze für die Massenspektrometrie mit Keratin zu vermeiden, wurden alle Schritte der Probenpräparation mit Handschuhen durchgeführt. Nachdem ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes SDS-Gel gründlich mit Bidest gewaschen worden war, wurde die Bande des zu untersuchenden Proteins aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ca.  $1\text{ mm}^3$  große Stücke



zerkleinert. Diese wurden 20 min in 250 µl 10 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Anschließend wurde die Waschlösung verworfen und die Gelstücke 2 x für je 15 min mit je 250 µl Puffer inkubiert, der zu gleichen Teilen aus Acetonitril und 10 mM Ammoniumbicarbonat bestand. Der Puffer wurde abgesaugt und die Gelstücke in der Speedvac getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden mit Verdaupuffer (990 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat, 10 µl Trypsinstammlösung (1 mg Trypsin in 1 ml 0,1 mM HCl)) rehydriert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die dabei entstandenen Peptide wurden aus dem Gel extrahiert. Dazu wurden 100 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat auf die Gelstücke gegeben und der Ansatz bei 37 °C für 1 h langsam geschüttelt. Die Probe wurde 1 min bei 3000 Upm zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde er in der Speedvac getrocknet. Die Gelstücke wurden noch 2 x mit je 100 µl 60 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) TFA für jeweils 30 min bei 37 °C extrahiert. Die Überstände wurden ebenfalls in das 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und in der Speedvac getrocknet. Die Aufreinigung der extrahierten Peptide mittels C<sub>18</sub>ZipTips (Millipore) erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 5.13.4 Peptidbibliothek

Die Spezifität von Proteinkinasen wird oft vor allem durch die Aminosäuren um die Phosphorylierungsstelle herum bestimmt. In diesen Fällen bieten Peptidbibliotheken eine einfache Möglichkeit, die Sequenzabhängigkeit der Phosphorylierung zu untersuchen [Tegge und Frank, 1998]. Im Fall von Prp4p sollten die Phosphorylierungsstellen dieser Kinase in Prp1p mit Hilfe einer Peptidbibliothek dieses Proteins identifiziert werden. Dazu wurden aus der Prp1-Sequenz 25 Peptide aus jeweils 15 Aminosäuren (s. Tab. 3.2) herausgesucht, wobei darauf geachtet wurde, daß alle Threonine aus Prp1p in diesen Peptiden enthalten sind. Die Peptide wurden mit Hilfe der SPOT-Methode an einem auf Cellulosepapier fixiertem Dipeptidanker synthetisiert [Frank und Overwin, 1996]. Ihre Sequenzen sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 angegeben. Nach der Synthese der Peptide wurde der Cellulosestreifen zusammengerollt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Er wurde 4 x mit Blockpuffer (1 mg/ml BSA; 100 mM MgCl<sub>2</sub> in Kinasepuffer (s. 5.10)) gewaschen, anschließend mit Blockpuffer bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Blocklösung wurde am nächsten Morgen abgegossen. Zu 1 ml Blockpuffer wurden ATP (Endkonzentration 100 µM); 25 µCi  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]dATP und 2,5 µg bakteriell exprimierte Prp4-Kinase gegeben. Diese Lösung wurde filtriert und in das Reaktionsgefäß mit dem Cellulosestreifen gegeben. Der Ansatz wurde für 2 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Im Anschluß wurde der Streifen aus Cellulosepapier jeweils 10 x mit je 1 ml 2 M NaCl und Bidest sowie 5 x mit je 1 ml Ethanol gewaschen. Danach wurde er getrocknet und die Radioaktivität der einzelnen Spots mit Hilfe eines PhosphorImagers bestimmt.

#### **5.13.5 Spaltung von Proteinen mit Ameisensäure**

Um die in einem Kinaseassay eingesetzten Proteine mit Ameisensäure zu spalten, wurden 47 µl Ameisensäure zu einem 20 µl Kinaseassay gegeben. Für die Spaltung größerer Mengen Protein, wie sie für die Identifizierung des phosphorylierten Prp1-Fragments mittels Massenspektrometrie benötigt wurden, wurde zunächst eine Acetonfällung durchgeführt und das Proteinpellet anschließend in 30 µl 70 %iger Ameisensäure resuspendiert. In beiden Fällen wurden die Ansätze für 18 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde zu den Ansätzen das 3fache Volumen Bidest gegeben. Die Flüssigkeit wurde in der SpeedVac verdampft. Anschließend wurden die getrockneten Fragmente in 20 µl 250 mM Tris-HCl, pH 9,0, aufgenommen und nach Zugabe der entsprechenden Menge Probenpuffer auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen.

## 6 Literatur

Affolter, M.; Watts, J.; Krebs, D. L.; Aebersold, R. (1994) Evaluation of Two-Dimensional Phosphopeptide Maps by Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Recovered Peptides. *Anal. Biochem.* **223**: 74 - 81

Alahari, S. K.; Schmidt, H.; Käufer, N. F. (1993) The fission yeast *prp4<sup>+</sup>* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4079 – 4083

Bähler, J.; Wu, J.-Q.; Longtine, M. S.; Shah, N. G.; McKenzie Ill, A.; Steever, A. B.; Wach, A.; Philippsen, P.; Pringle, J. R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943 - 951

Bartels, C., Klatt, C.; Lührmann, R.; Fabrizio, P. (2002) The ribosomal translocase homologue Snu114p is involved in unwinding U4/U6 RNA during activation of the spliceosome. *EMBO reports* **3**: 875 - 880

Bartels, C.; Urlaub, H.; Lührmann, R.; Fabrizio, P. (2003) Mutagenesis Suggests Several Roles of Snu114p in Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.* **278**: 28324 - 28334

Basi, G.; Schmid, E.; Maundrell, K. (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promotor affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**: 131 - 136

Bossemeyer, D. (1995) Protein kinases - structure and function. *FEBS* **369**: 57 - 61

Bottner, C. Persönliche Mitteilung, Institut für Genetik. TU Braunschweig

Boudrez, A., Beullens, M.; Waelkens, E.; Stalmans, W.; Bollen, M. (2002) Phosphorylation-dependent Interaction between the Splicing Factors SAP155 and NIPP1. *J. Biol. Chem.* **277**: 31834 - 31841

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 - 254

- Brow, D. A. (2002) Allosteric Cascade of Spliceosome Activation. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 333 - 360
- Brown, M. G.M.; Weston, A.; Sounders, J.R.; Humphreys, G.O (1975) Transformation of *E.coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth. *FEMS Micobiol. Lett.* **5**: 219 - 222
- Burge, C. B.; Tuschl, T. H.; Sharp, P. A. (1999) Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In: Gesteland R. F.; Cech, T. R.; Atkins, J. F. (eds) RNA world II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 525 - 560
- Chen, C.-H.; Yu, W.-C.; Tsao, W. Y. ; Wang, L.-Y.; Chen, H.-R.; Lin, J.-Y.; Tsai, W.-Y. Cheng, S.-C. (2002) Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. *Nucleic Acids Res.* **30**: 1029 - 1037
- Chan, S.-P.; Kao, D.-I.; Tsai, W.-Y.; Cheng, S.-C. (2003) The Prp19p-Associated Complex in Spliceosome Activation. *Science*
- Craven, R. A.; Griffiths, D. J. F.; Sheldrick, K. S.; Randall, R. E.; Hagan, I. M.; Carr, A. M. (1998) Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **221**: 59 - 68
- Dellaire, G.; Makarov, E. M.; Cowger, J. J.; Longman, D.; Sutherland, H. G. Lührmann, R.; Torchia, J.; Bickmore, W. A. (2002) Mammalian PRP4 kinase copurifies and interacts with components of both the U5 snRNP and the N-CoR deacetylase complexes. *Mol Cell Biol* **22**: 5141 - 5156
- Deshaies, R. J. (1995) The self-destructive personality of a cell cycle in transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 781 - 789
- Forsburg, S. L. (2001) The art and design of genetic screens: yeast. *Nature Reviews Genetics* **2**: 659 - 668
- Frank, R.; Overwin, H. (1996) SPOT-synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes, in *Methods in Molecular Biology*, vol 66: *Epitope Mapping Protocols* (Morris, G. E., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp 149 - 169

- Gallison, F.; Legrain, P. (1993) The biochemical defects of *prp4-1* and *prp6-1* yeast splicing mutants reveal that the PRP6 protein is required for the accumulation of the [U4/U6.U5] tri-snRNP. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1555 - 1562
- Gatermann, K. B.; Rosenberg, G. H.; Käufer, N. F. (1988) Doublestranded sequencing using mini prep plasmids, in eleven hours. *BioTechniques* **6**: 7
- Gozani, O.; Potashkin, J.; Reed, R. (1998) A potential role for U2AF-SAP155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site. *Mol Cell Biol.* **18**: 4752 - 4760
- Gracy, R. W. (1977) Two Dimensional Thin-Layer Methods. *Methods in Enzymology* **47**: 195 - 204
- Groß, T.; Lützelberger, M.; Wiegmann, H.; Klingenhoff, A.; Shenoy, S.; Käufer, N. F. (1997) Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucleic Acids Res* **25**: 1028 - 1035
- Groß, T.; Richert, K.; Mierke, C.; Lützelberger, M.; Käufer, N. F. (1998) Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **26**: 505 - 511
- Hanks, S. K.; Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**: 576 - 596
- Hanks, S. K. (2003) Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* **4**:111
- Holland, P. M.; Cooper, J. A. (1999) Protein modification: Docking sites for kinases. *Curr Biol* **9**: R329 – R331
- Huang, T.; Vilardell, J.; Query, C. C. (2002) Pre-spliceosome formation in *S. pombe* requires a stable complex of SF1-U2AF<sup>59</sup>-U2AF<sup>23</sup>. *EMBO J* **21**: 5516 - 5526
- Janknecht, R.; de Martynoff, G.; Lou, J.; Hipkind, R. A.; Nordheim, A.; Stunnenberg, H. G. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged proteins expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8972 - 8976

- Jelinek, T.; Weber, M. J. (1993) Optimization of the Resolution of Phosphoamino Acids by One-Dimensional Thin-Layer Electrophoresis. *BioTechniques* **15**: 629 - 630
- Käufer, N. F. Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik.TU Braunschweig
- Käufer, N. F.; Potashkin, J. (2000) Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3003 - 3010
- Kemp, B. E.; Pearson, R. B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 342 - 346
- Kojima, T.; Zama, T.; Wada, K.; Onogi, H.; Hagiwara, M. (1991) Cloning of human PRP4 reveals interaction with Clk1. *J Biol Chem* **276**: 32247 - 32256
- Kunkel, T. A.; Roberts, J.D.; Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**: 367 - 382
- Kuhn, A. N.; Brow, D. A. (2000) Suppressors of a cold-sensitive mutation in yeast U4 RNA define five domains in the splicing factor Prp8p that influence spliceosome activation. *Genetics* **155**: 1667 - 1682
- Kuhn, A. N.; Reichl, E. M.; Brow, D. A. (2002) Distinct domains of splicing factor Prp8 mediate different aspects of spliceosome activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9145 - 9149
- Kuhn, A. N.; Käufer, N. F. (2002) Mechanism an control of pre-mRNA splicing. In: Egel, R. (eds) *Molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Kuhn, A. N., Käufer, N. F. (2003) Pre-mRNA splicing in Schizosaccharomyces pombe. Regulatory role of a kinase conserved from fission yeast to mammals. *Curr Genet* **42**: 241 - 251
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680 - 685

- Lamb, J. R.; Tugendreich, S.; Hieter, P. (1995) Tetra-trico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *TIBS* **20**: 257 - 259
- Lee, K.; Du, D. Horn, M.; Rabinow, L. (1996) Activity and Autophosphorylation of LAMMER Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 27299 - 27303
- Le Hir, H.; Izaurralde, E.; Maquat, L. E.; Moore, M. J. (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20 – 24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* **19**: 6860 - 6869
- Leupold, U. (1950) Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.* **24**: 381 – 480
- Lottspeich, F. (1998) Bioanalytik. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- Lührmann, R. Persönliche Mitteilung. MPI Göttingen
- Lützelberger, M.; Groß, T.; Käufer, N. F. (1999) Srp2, a SR protein family member of fission yeast - *in vivo* characterization of its modular domains. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2618 – 2626
- Mahboub, S.; Richard, C.; Delacourte, A.; Han, K.-K. (1985) Application of Chemical Cleavage Procedures to the Peptide Mapping of Neurofilament Triplet Protein Bands in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **154**: 171 - 182
- Makarov, E. M.; Makarova, O. V.; Achsel, T.; Lührmann, R. (2000) The Human Homologue of the Yeast Splicing Factor Prp6p Contains Multiple TPR Elements and is Stably associated with the U5 snRNP *via* Protein-Protein Interactions. *J. Mol. Biol.* **298**: 567 - 575
- Makarov, W. M.; Makarova, O. V.; Urlaub, H.; Gentzel, M.; Will, C. L.; Wilm, M.; Lührmann, R. (2002) Small Nuclear Ribonucleoprotein Remodeling During Catalytic Activation of the Spliceosome. *Science* **298**: 2205 - 2208
- Mann, M.; Ong, S. - E.; Grøborg, M.; Steen, H.; Jensen, O. N.; Pandey, A. (2002) Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry; deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* **20**: 261 - 268

- Maroney, P. A.; Romfo, C. M.; Nilsen, T. W. (2000) Functional recognition of 5' splice site by U4/U6.U5 tri-snRNP defines a novel ATP-dependent step in early spliceosome assembly. *Mol Cell* **6**: 317 - 328
- Maundrell, K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, **123**: 127 - 130
- Mayeda, A.; Badolato, J.; Kobayashi, R.; Zhang, M. Q.; Gardiner, E. M.; Krainer, A. R. (1999) Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *EMBO J* **18**: 4560 - 4570
- McDonald, W. H.; Ohi, R.; Smelkova, N.; Friendewey, D.; Gould, K. L. (1999) Myb-related fission yeast Cdc5p is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* **19**: 5352 - 5362
- Misteli, T.; Cáceres, J. F.; Clement, J. Q.; Krainer, A. R.; Wilkinson, M. F.; Spector, D. L. (1998) Serine Phosphorylation of SR Proteins Is Required for Their Recruitment to Sites of Transcription In Vivo. *J. Cell Biol.* **143**: 297 – 307
- Misteli, T. (1999) RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Curr Biol* **9**: R198 - R200
- Mitchinson, J. M. (1970) Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Cell Physiol.* **4**: 131 - 165
- Moreno, S.; Klar, S.; Nurse, P. (1991) Molecular Genetic Analysis of Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**: 795 - 823
- Murray, M. V. (1999) Role of Phosphorylation in Pre-mRNA Splicing. In: Chew, S. L. (ed) Post-Transcriptional Processing and the Endocrine System. *Front Horm Res.* Basel, Karger, pp 83 - 100
- Neubauer, G.; Dreger, M. (1999) Phosphopeptidanalytik mittels Nanoelektrospray-Massenspektrometrie: Die Parent-Ion-Scan-Technik zur sensitiven Bestimmung von Phosphorylierungsstellen. *Biospektrum* **5**: 386 - 390



- Newman, A. (2001) RNA enzymes for RNA splicing. *Nature* **413**: 695 - 696
- Nottrott, S., Urlaub, H.; Lührmann, R., (2002) Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 proteins. *EMBO J.* **21**: 5527 - 5538
- Ohi, M. D.; Link, A. J.; Ren, L.; Jennings, J. L.; McDonald, W. H.; Gould, K. L. (2002) Proteomic analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol.* **22**: 2011 - 2024
- Opitz, F. (2001) Isolierung und funktionale Charakterisierung von *prp5* und seinem Allel *prp5-1* - Untersuchungen zur Interaktion von Prp5p mit Prp4p. Diplomarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig
- Potashkin, J.; Kim, D.; Fons, M.; Humphrey, T.; Friendewey, D. (1998) Cell-division-cycle defects associated with fission yeast pre-mRNA splicing mutants. *Curr. Genet.* **34**: 153 - 163
- Quadroni, M.; James, P. (2000) Phosphopeptide analysis. *Proteomics in Functional Genomics* 199 - 213 ed. by Jollès P. and Jörnwall, H. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland
- Richert, Kathrin (2002) Untersuchungen zur Aufklärung des prä-mRNA Spleißvorgangs in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*: genetische und biochemische Charakterisierung der Interaktionen des *prp4* Gens. Doktorarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig
- Rosenberg, G. H.; Alahary, S. K.; Käufer, N. F. (1991) *prp4* from *Schizosaccharomyces pombe*, a mutant deficient in pre-mRNA splicing isolated using genes containing artificial introns. *Mol Gen Genet* **226**: 305 - 309
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977) DNA Sequencing with Chain terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463 - 5467
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schmidt, H.; Richert, K.; Drakas, R. A.; Käufer, N. F. (1999) *spp42*, identified as a classical suppressor of *prp4-73*, which encodes a kinase involved in pre-mRNA splicing in fission yeast, is a homologue of the splicing factor Prp8p. *Genetics* **153**: 1183 - 1191

Schmidt, W. (1999) Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine und Test auf deren Eignung als *in vitro*-Substrate der Prp4-Kinase aus *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig

Schwelnus, W.; Richert, K.; Opitz, F. Groß, T., Habara, Y.; Tani, T.; Käufer, N. F. (2001) Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBO reports* **2**: 35 - 41

Sharp, P. A. (1994) Split Genes and RNA Splicing. *Cell* **77**: 805 - 815

Sontheimer, E. J. (2001) The Spliceosome shows its metal. *Nature Struct. Biol.* **8**:11 - 13

Staley, J. P.; Guthrie, C. (1998) Mechanical Devices of the Spliceosome: Motors, Clocks, Springs, and Things. *Cell* **92**: 315 - 326

Stevens, S. W.; Ryan, D. E.; Ge, H. Y.; Moore, R. E.; Young, M. K.; Lee, T. D.; Abelson, J. (2002) Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol Cell* **9**: 31 - 44

Tang, Z.; Kuo, T.; Shen, J.; Lin, R.-J. (2000) Biochemical and Genetic Conservation of Fission Yeast Dsk1 and Human SR Protein-Specific Kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 816 - 824

Tang, Z.; Käufer, N. F.; Lin, R.-J. (2002): Interactions between two fission yeast serine/arginine-rich proteins and their modulation by phosphorylation. *Biochem. J.* **368**: 527 - 534

Tegge, W. J.; Frank, R. (1998) Analysis of Protein Kinase Substrate Specificity by the Use of Peptide Libraries on Cellulose Paper (SPOT-Method). *Methods Mol. Biol.* **87** . 99 - 106

Urlaub, H. Persönliche Mitteilung. MPI Göttingen

- Urushiyama, D.; Tanis, T.; Ohshima, Y. (1996) Isolation of novel pre-mRNA splicing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 118 - 127
- Urushiyama, D.; Tani, T.; Ohshima, Y. (1997) The *prp1*<sup>+</sup> gene required for pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein that contains TPR motifs and is similar to Prp6p of budding yeast. *Genetics* **147**: 101 – 115
- van der Geer; P.; Luo, K.; Sefton, B. M.; Hunter, T. (1993) Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis on cellulose thin-layer plates. In *Protein Phosphorylation – A Practical Approach series* (ed. by Hardie, D. G.) Oxford University Press
- Valadkhan, S.; Manley, J. L. (2001) Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* **413**: 701 - 707
- Wang, C.; Chua, K.; Seghezzi, W.; Lees, W., Gozani, O., Reed, R. (1998): Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis. *Genes Dev.* **12**: 1409 - 1414
- Yanish-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19-vectors. *Gene* **33**: 103 - 119

## 7 Anhang

### 7.1 Aminosäuresequenz von Prp1p

Aminosäuresequenz des Prp1-Proteins aus *S. pombe* (GenBank acc. No. D83743)

1	MANFYPDFLNMQPPPNYVAGLGRGATGFTTTRSDLGPAQELPSQESIKAAI	50
51	EQRKSEIEEEEDIDPRYQDPDNEVALFATAPYDHEDEEADKIYQSVEEHL	100
101	SKRRKSQREKQEQQLQKEKYEKENPKVSSQFADLKRGLSTLTDEDWNNIPE	150
151	PGDLTRKKRTKQPRRERFYATSDFVLASARNENQAISNFAVDTQAGTETP	200
201	DMNGTKTNFVEIGAARDKVLGIKLAQASSNLTSPSTIDPKGyltSLNSMV	200
251	PKNANDLGDIRKARKLLQSVIETNPKHASGWVAAARLEEVANKLSQAQSL	300
	<b>TPR1</b>	
301	ILKGCENCsrSEdVWLEAIRLHPAAEAKVIIANAVKKLPKSVTLWLEAEK	350
	<b>TPR2</b> <b>TPR3</b>	
351	LENQAQHKKRIKKALEFNPTSVSLWKEAVNLEEEVDNARILLARAVELI	400
	<b>TPR4</b>	
401	PMSIDLWLALARLETYENAKKVLNkarQTIRTSHEVWIAAARLEEQQGNV	450
	<b>TPR5</b> <b>TPR6</b>	
451	SRVEKIMARGVSELQATGGMLQRDQWLSEAekCETEGAVITAQAIINTCL	500
	<b>TPR7</b>	
501	GVGLDEEDQFDTWLDDAQSFIAKCIDCARAVFAFSLRVYPKSEKLWLRa	550
	<b>TPR8</b> <b>TPR9</b>	
551	VELEKLYGTTESVCSILEKAVESCPKAEILWLLYAKERKNVNDIAGARNI	600
	<b>TPR10</b>	
601	LGRAFEYNSNSEEIWLAaVRIEFVNNENERARKLLARARIESGTERIWTk	650
	<b>TPR11</b> <b>TPR12</b>	
651	SISLERILDEKDRALQlLENALKIYPHYDKLYMMKGQIFEDKEQIELARD	700
	<b>TPR13</b>	
701	AYLAGTKVCPYSIPLWLLlAKLEEKQSVIRARVVFDRAKVKNPkNEFLWL	750
	<b>TPR14</b> <b>TPR15</b>	
751	ELIKMELRAGNISQVRAALAKALQECpSSGLLWTEAIWLEPRAQRKTRAT	800
	<b>TPR16</b>	
801	DALRKCEGNAHLLCTIARMLWLEKKADKARSWFLKAVKADQDNGDVWCWF	850
	<b>TPR17</b> <b>TPR18</b>	
851	YKYSLEAGNEDQqKEVLTSFETADPHHGyFWPSITKDIKNSRKTPQELLH	900
	<b>TPR19</b>	
901	LAINVL	906

## 7.2 Sequenzen und Massen tryptischer Prp1-Peptide

Folgende Peptide entstehen bei der Spaltung von Prp1p mit Trypsin:

Masse [Da]	Position	Peptidsequenz
4458,075	483 - 523	CETEGAVITAQAIIINTCLGVGLDEEDQFDTWLDDAQSFAR
2882,227	67 - 91	YQDPDNEVALFATAPYDHEDEEADK
2753,232	181 - 206	NENQAISNFAVDTQAGTETPDMNGTK
2612,242	1 - 23	MANFYPDFLNMQPPPNYVAGLGR
2562,230	865 - 886	EVLTSFETADPHHGYFWPSITK
2399,206	772 - 792	ALQECPSGGLWTEAIWLEPR
2343,110	136 - 156	GLSTLTDEDWNNIPEPGDLTR
1998,956	604 - 620	AFEYNSNSEIWLAAVR
1911,077	396 - 412	AVELIPMSIDLWLALAR
1746,722	839 - 852	ADQDNGDVWCWFYK
1729,897	224 - 240	LAQASSNLTSPSTIDPK
1698,854	32 - 47	SDLGPAQELPSQESIK
1615,928	708 - 721	VCPYSIPLWLLAK
1542,772	556 - 569	LYGTTESVCSILEK
1491,784	365 - 377	ALEFNPTSVSLWK
1487,697	378 - 390	EAVNLEEEVDNAR
1460,847	894 - 906	TPQELLHLAINVL
1447,722	168 - 180	FYATSDFVLASAR
1446,737	460 - 473	GVSELQATGGMLQR
1400,677	806 - 818	CEGNAHLLCTIAR
1381,623	853 - 864	YSLEAGNEDQQK
1332,679	92 - 102	IYQSVEEHLSK
1309,682	241 - 252	GYLTSLNSMVPK
1304,725	745 - 754	NEFLWLELIK
1263,596	621 - 630	IEFVNNENER
1241,710	266 - 276	LLQSVIETNPK
1240,643	432 - 442	TSHEVWIAAAR
1219,708	577 - 586	AEILWLLYAK
1217,616	311 - 320	SEVDWLEAIR
1175,631	341 - 350	SVTLWLEAEK
1159,570	443 - 452	LEEYYGNVSR
1112,667	664 - 673	ALQLLENALK

1105,516	474 - 482	DQWLSEAEK
1100,667	294 - 303	LSQAQSLILK
1077,569	207 - 216	TNFVEIGAAR
1025,527	277 - 286	HASGWVAAAR
994,520	126 - 134	VSSQFADLK
987,485	253 - 261	NANDLGDIR
967,496	351 - 358	LENQAQHK
967,473	413 - 420	LETYENAK
935,462	674 - 680	IYPHYDK
929,480	590 - 598	NVNDIAGAR
910,514	531 - 538	AVFAFSLR
858,468	693 - 699	EQIELAR
844,464	759 - 766	AGNISQVR
838,430	700 - 707	DAYLAGTK
836,462	321 - 328	LHPAAEAK
836,415	686 - 692	GQIFEDK
827,535	329 - 336	VIIANAVK
819,443	819 - 824	MLWLEK
810,410	24 - 31	GATGFTTR
802,430	287 - 293	LEEVANK
791,389	640 - 646	IESGTER
773,415	111 - 116	QEQLQK
768,276	304 - 310	GCENCSR
733,355	570 - 576	AVESCPK
704,394	651 - 656	SISLER
688,388	550 - 555	AVELEK
687,378	48 - 53	AAIEQR
685,341	681 - 685	LYMMK
680,377	831 - 835	SWFLK
680,285	525 - 530	CIDCAR
646,352	799 - 804	ATDALR
635,351	733 - 737	VVFDR
617,350	657 - 661	ILDEK
602,362	726 - 730	QSVIR
587,366	546 - 549	LWLR
585,408	391 - 395	ILLAR

572,351	599 - 603	NILGR
548,286	755 - 758	MELR
547,324	647 - 650	IWTK
529,371	219 - 223	VLGIK
518,282	722 - 725	LEEK
517,309	428 - 431	QTIR
506,297	539 - 542	VYPK

Es wurde die Masse für einfach geladene Peptide  $[M+H]^+$  angegeben. Peptide mit einer Masse von weniger als 500 Da wurden nicht aufgeführt.